



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
MELHORAMENTO DE PLANTAS**

**ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E
ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE DIFERENTES
GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR**

PAULO ROBERTO FARIA

Orientador:
Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov

Agosto – 2012

PAULO ROBERTO FARIA

**ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E
ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE
CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, da Universidade Federal de Goiás, como exigência para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.

Orientador:

Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov

Coorientadora:

Prof^a. Dr^a. Leila Garcês de Araújo

GOIÂNIA, GO - Brasil

2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG**

F224i Faria, Paulo Roberto.
Isolamento de bactérias endofíticas e estabelecimento *in vitro* de diferentes genótipos de cana-de-açúcar [manuscrito] / Paulo Roberto Faria. - 2012.
83 f. : il., figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás,
Escola de Agronomia, 2012.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

Apêndices.

1. Cana de açúcar – Bactérias 2. Patologia vegetal 3.
Cana de açúcar – Genótipos 4. Antibióticos. I. Título.

CDU: 633.61:632.35:575.22

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor	PAULO ROBERTO FARIA		
E-mail:	prfaria10@gmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? ☒ Sim ☐ Não			
Vínculo empregatício do autor	Universidade Federal de Goiás		
Agência de fomento:		Sigla:	
País:	Brasil	UF:	GO
		CNPJ:	
Título:	Isolamento de bactérias endofíticas e estabelecimento <i>in vitro</i> de diferentes genótipos de cana-de-açúcar.		
Palavras-chave:	Micropropagação, <i>Saccharum</i> , diversidade bactéria, antibiótico.		
Título em outra língua:	Isolation of endophytic bacteria and <i>in vitro</i> establishment of different genotypes of sugarcane.		
Palavras-chave em outra língua:	Micropropagation, sugarcane, bacteria.		
Área de concentração:	Genética e Melhoramento de Plantas		
Data defesa:	10/08/2012		
Programa de Pós-Graduação:	Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, da Universidade Federal de Goiás.		
Orientador:	Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov		
E-mail:	stsibov@yahoo.com.br		
Co-orientadora:*	Prof ^a . Dr ^a . Leila Garcês de Araújo		
E-mail:	leilagarcesaraujo@gmail.com		

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Data: 08 / 09 / 2012

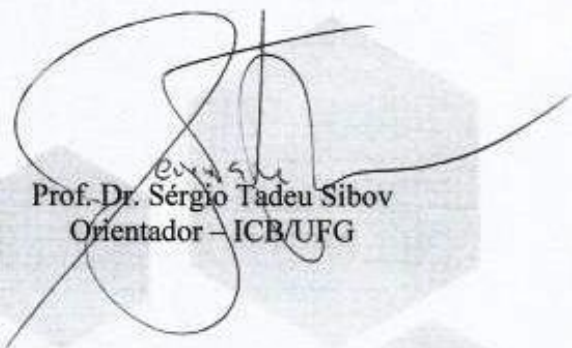
Assinatura do autor

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

PAULO ROBERTO FARIA

TÍTULO: "Isolamento de bactérias endofíticas e estabelecimento in vitro de diferentes genótipos de cana-de-açúcar"

Dissertação DEFENDIDA em 10 de Agosto de 2012, e APROVADA pela Banca Examinadora constituída pelos membros:



Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov
Orientador – ICB/UFG



Prof.ª Dr.ª Maurízia de Fátima Carneiro
EMATER/GO



Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira
IPTSP/UFG

Goiânia - Goiás
Brasil

Este trabalho é dedicado com carinho

Ao meu Deus pelo dom da vida e pela oportunidade de realizar este curso.

A meu pai Sr. Benedito (Mineirão), por ter me incentivado e apoiado em minha vida acadêmica.

À memória de minha mãe Dona Nelzita, que sempre manifestou orgulho pelo estudo de seus filhos, nos fazendo ver que a Fé e a educação seria um caminho para uma vida melhor.

A minha família pela compreensão e apoio, em especial a minha esposa Adriana, as filhas Hellen Geovana, Júlia Gabrielly e Sarah Maressa.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Goiás pela oportunidade de realização deste trabalho e por oferecer um curso gratuito e de qualidade.

À Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás (PGMP-UFG), pelo empenho, profissionalismo e zelo para com o curso.

Ao meu Orientador Professor Dr. Sérgio Tadeu Sibov, por me aceitar como orientando, pela competência, pelo exemplo de disposição na busca de soluções, nos trabalhos de campo e de laboratório, pela valiosa orientação e agradável convivência e amizade.

A Coorientadora Profa. Dra. Leila Garcês, pela amizade, confiança, sugestões, pelo acompanhamento das atividades, pela boa vontade, disponibilização de material e nas diversas consultas da elaboração deste trabalho.

Aos Professores Dr. Américo, Dr. João Batista, Dra. Patrícia, Dr. Lázaro e demais professores do PGMP pelo esforço em nos oferecer o melhor de suas informações e conhecimentos.

Ao ICB-UFG, nas pessoas dos Professores Dr. Reginaldo Nasser e Dr. Cirano Ulhoa, pelo apoio recebido durante o curso.

Aos Professores Dr. Renato, Dra. Mariana, Dra. Letícia, Dr. Francis e demais professores do Departamento de Biologia Geral-ICB/UFG.

Ao Prof. Dr. José Daniel do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia do IPTSP da UFG pela sua contribuição fundamental ao meu trabalho, pela competência, pela disposição no acompanhamento dos trabalhos de Laboratório, pela convivência e pela amizade iniciada.

Aos amigos e colegas de turma: Ana Clara, Edivaldo, Eduardo, Ana Letícia, Artur, Fernanda e Kellen Cristhina, pela paciência nas intermináveis horas de estudo, revisão, e na discussão de trabalhos.

Aos Estagiários do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetal da UFG: Diego Caldas pelas sugestões, pelo acompanhamento dos trabalhos de campo e laboratório, pela convivência e pela amizade. Nikolas, Rogério, Vitor, Maria, Anderson, Lílian, Fernanda, Daniela, Luciano, Talita e tantos outros que se dispuseram a plantar, coletar, transportar, inocular, avaliar, enfrentando chuva e sol, muito obrigado.

Aos Bolsistas do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia da UFG: Bruno Francesco, Jussara Carrim, Lia Wentzel, Marcus Araujo pelas contribuições e dedicação.

Dra. Lucília e Geralda do Laboratório de Química de Produtos Naturais do IQ/UFG pelo auxílio com teste com anti-oxidantes.

Ao pessoal da Ridesa-Goiânia, Manuela, Carlão, Danilo, Renata, e todo o pessoal de apoio que ajudou a plantar, transportar e coletar.

Ao Dr. Marcio Barbosa, Emanuelle, Caroline e Marconi, pelo estágio no Laboratório de cultura de tecidos vegetais do Departamento de Fitotecnia da UFV.

A todos aqueles que direta ou indiretamente ajudaram na elaboração deste trabalho e que por ventura tiveram seus nomes esquecidos.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS	13
RESUMO	15
ABSTRACT	16
1 INTRODUÇÃO GERAL	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 CANA-DE-AÇÚCAR	20
2.1.1 Origem da cana-de-açúcar	20
2.1.2 Classificação botânica	20
2.1.3 Histórico da cana-de-açúcar no mundo	20
2.1.4 Histórico da cana-de-açúcar no Brasil	21
2.1.5 A cana-de-açúcar no contexto econômico mundial	22
2.1.6 A cana-de-açúcar no contexto econômico nacional	22
2.1.7 A cana-de-açúcar no contexto econômico goiano	23
2.2 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS	23
2.2.1 Definições	23
2.2.2 Etapas do cultivo <i>in vitro</i>	24
2.2.3 O crescimento <i>in vitro</i>	24
2.2.4 Meio de cultura	25
2.2.5 Vantagens da micropropagação	25
2.2.6 Cultura de tecidos em cana-de-açúcar	26
2.3 MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS	27
2.3.1 Definições	27
2.3.2 Endofíticos em cana-de-açúcar	28
2.3.3 Descontaminação	29
2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
3 CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO DE EXPLANTES DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA ESTABELECIMENTO DE CULTURA <i>IN VITRO</i>	

RESUMO	38
ABSTRACT	38
3.1 INTRODUÇÃO.....	39
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.2.1 Descontaminação	40
3.2.2 Inoculação	41
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
3.4 CONCLUSÕES	45
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
4 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS À CANA-DE-AÇÚCAR	
RESUMO	47
ABSTRACT	47
4.1 INTRODUÇÃO	48
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	50
4.2.1 Isolamento de bacterias	50
4.2.2 Determinação de características fisiológicas e bioquímicas dos isolados	50
4.2.2.1 Caracterização morfo-tintorial	51
4.2.2.2 Determinação de características de atividades enzimáticas pelos isolados endofíticos	52
4.2.3 Produção de fatores de crescimento vegetal	53
4.2.3.1 Teste para solubilização de fosfato	53
4.2.3.2 Teste para produção de ácido indol-acético	53
4.2.4 Teste para sensibilidade a antimicrobianos	54
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.3.1 Isolamento e identificação preliminar	54
4.3.2 Produção de fatores de crescimento vegetal	56
4.3.3 Teste para sensibilidade a antimicrobianos	56
4.4 CONCLUSÕES	63
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
5 MICROPROPAGAÇÃO DE CULTIVARES DE CANA-DE- AÇÚCAR A PARTIR DO CULTIVO DE ÁPICES CAULINARES <i>IN VITRO</i>	

RESUMO	68
ABSTRACT	68
5.1 INTRODUÇÃO	69
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	70
5.2.1 Material vegetal	71
5.2.2 Descontaminação	71
5.2.3 Experimento de multiplicação	71
5.2.4 Experimento de enraizamento	72
5.2.5 Análise estatística	73
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
5.3.1 Isolamento e identificação preliminar	73
5.3.1.1 Número de brotos	73
5.3.1.2 Tamanho de brotos	76
5.3.2 Experimentos de enraizamento	76
5.4 CONCLUSÕES	80
5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
6 CONCLUSÕES GERAIS	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Diferentes tratamentos de desinfestação de cana-de-açúcar para cultivo in vitro.	41
Tabela 3.2	Dados de análise de variância, relacionados a contaminação de explante de cana-de-açúcar por fungos e bactérias inoculados em meio MS, após 25 dias de cultivo.	43
Tabela 4.1	Características morfológicas, tintoriais e identificação dos isolados bacterianos de cultura de tecido de cana-de-açúcar.	55
Tabela 4.2	Atividades enzimáticas dos isolados bacterianos de cultura de tecido de cana-de-açúcar.	56
Tabela 4.3	Atividade de Produção de fatores de crescimento dos isolados bacterianos de cultura de tecido de cana-de-açúcar.	59
Tabela 4.4	Antibiograma dos isolados bacterianos de cultura de tecido de cana-de-açúcar.	62
Tabela 5.1	Diferentes combinações de KIN, BAP, ANA e GA ₃ em teste de brotação em três cultivares de cana-de-açúcar.	72
Tabela 5.2	Diferentes combinações de meio líquido, sólido, ANA e carvão ativado em enraizamento de brotos em três cultivares de cana-de-açúcar.	73
Tabela 5.3	Efeito de diferentes combinações de KIN, BAP, ANA E GA ₃ em teste de brotação em três cultivares de cana-de-açúcar.	75
Tabela 5.4	Efeito de diferentes combinações de meio líquido, sólido, ANA e carvão ativado em enraizamento de brotos em três cultivares de cana-de-açúcar.	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1	Etapas para isolamento do ápice caulinar de cana-de-açúcar variedade RB98710 com 6 meses, 01) aspecto da planta; 02) região do corte; 03) segmento apical; 04) Palmito sem as bainhas foliares e 05) palmito com ápice caulinar.	40
Figura 3.2	A partir de colmos da planta adulta foram obtidos os “palmitos” (01) para a retirada do ápice caulinar. Estes palmitos são desinfestados (02) utilizando reagentes como: hipoclorito de sódio, fungicidas e etanol. Após a desinfecção dos palmitos, retiram-se os ápices caulinares (3, 4 e 5) que são inoculados em frascos contendo meio de cultura semi-sólido (6).	42
Figura 3.3	Explantes de cana-de-açúcar evidenciando contaminação por: bactérias 01 e 02 em meio sólido 5 dias após a inoculação, 03 meio líquido 25 dias após inoculação.	43
Figura 3.4	Explantes de cana-de-açúcar evidenciando contaminação por: fungos 01 em meio sólido 5 dias após a inoculação, 02 e 03 em meio líquido 5 dias após inoculação.	44
Figura 4.1	01 Detalhe do Inoculador de Stryer, 02 e 03 detalhe da inoculação	51
Figura 4.2	Microfotografia dos isolados corados pela coloração de Gram. Aumento de 1.000X.	57
Figura 4.3	Determinação da produção de AIA por isolados de bactérias endofíticas de cana-de-açúcar em meio de cultura com e sem L-Triptofano. I) Isolado 08A com L-Triptofano, II) Isolado 08A sem L-Triptofano, III) Isolado 05 com L-Triptofano, IV) Isolado 05 sem L-Triptofano, V) Isolado 06 com L-Triptofano, VI) Isolado 06 sem L-Triptofano, VII) Isolado 07 com L-Triptofano, VIII) Isolado 07 sem L-Triptofano. A coloração rósea nos tubos indica capacidade produtora de AIA.	58
Figura 4.4	Teste de solubilização de fosfato em bactérias endofíticas de cana-de-açúcar. I) Isolado 02, II) Isolado 04, III) Isolado 05, IV) Isolado 06, V) Isolado 07, VI) Isolado 8A, VII) Isolado 8B. Os halos claros ao redor das colônias indicam capacidade de solubilizaçã.	60
Figura 4.5	Teste para determinação da sensibilidade de isolados endofíticos de cana-de-açúcar, após 24h de incubação a 30°C. O diâmetro da zona de	

	inibição de crescimento ao redor dos discos é indicativo de sensibilidade.	61
Figura 5.1	Teste de brotação com ápices caulinares da variedade RB034130 em meio MS líquido. 01) Cana recém-inoculada; 02) brotação após 14 dias, 03) brotação após 28 dias 04) brotação após 42 dias.	74
Figura 5.2	Explante de cana-de-açúcar, brotações, da variedade RB034130, em todos os tratamentos foi utilizado o meio MS com metade da concentração, suplementado com 6% de sacarose. 01) T1 meio líquido; 02) T2 meio sólido; 03) T3 meio líquido + 5 mg ANA; 04) T4 meio sólido 5 mg ANA; 05) T5 meio sólido + 5 mg ANA + 2g de carvão.	77

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

% - Porcentagem

± - Variando entre

> – Maior

μL – Microlitro

°Brix - Graus Brix

°C – Graus Celsius

2,4-D – 2,4 ácido diclorofenoxiacético

ABA – Ácido abscísico

AIA – Ácido indolacético

AIB – Ácido Indol-Butírico

ANA – Ácido naftalenoacético

BAP – 6-Benzilaminopurina

BA – Benziladenina

BHI - Infusão de Cérebro e Coração – *Brain and Heart Infusion*

cm – Centímetros

CO₂ – Dióxido de carbono

CV – Coeficiente de variação

Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

g - Grama

GA₃ – Ácido giberélico

GL – Graus de liberdade

h – Horas

ha – hectares

KIN - Cinetina

Km – Kilômetros

LCTV – Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais

LED – Diodo Emissor de Luz - *Light Emitting Diode*

m – Metros

mg.L⁻¹ – Miligrama por litro

min. – Minutos

mL – Mililitros

mm – Milímetros

$\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ – micromol por metro quadrado por segundo

MS – Meio Murashige & Skoog (1962)

MS^{1/2} – Meio Murashige & Skoog (1962) com redução à metade da concentração dos macronutrientes

NaOCl – Hipoclorito de sódio

p – p valor

pH – Potencial hidrogeniônico

RB – República do Brasil

sp. – Espécie

TDZ – Thidiazuron

TSA - Trypticase Soy Agar

v/v – Volume por volume

WPM – Wood Plant Médium

RESUMO

FARIA, P. R. **Isolamento de bactérias endofíticas e estabelecimento *in vitro* de diferentes genótipos de cana-de-açúcar.** 2012. 85 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.²

Na micropropagação, fragmentos de tecidos vegetal chamados explantes são isolados, desinfetados e cultivados assepticamente em meio de cultura. Porém, a oxidação e a contaminação são os principais problemas no início do processo de cultura de tecidos de plantas. Com o objetivo de iniciar metodologias de estabelecimento *in vitro* de variedades selecionadas de cana-de-açúcar foram realizados tratamentos de descontaminação de ápices caulinares com diferentes tempos de exposição e concentrações de hipoclorito de sódio, casugamicina, etanol e bicloreto de mercúrio. Não houve problemas de oxidação em nenhum dos tratamentos. O uso dos reagentes nas concentrações e tempos testados não mostrou ser fitotóxico, no tratamento utilizando os maiores tempos de exposição à casugamicina e ao hipoclorito de sódio obteve os menores índices de contaminação por fungos e bactérias. Porém, os índices de contaminação bacteriana foram elevados, o que indica a necessidade de uso de novos procedimentos para o processo de descontaminação. Sabe-se que a cana-de-açúcar está associada a diferentes bactérias endofíticas. Com o objetivo de melhor estudar estas bactérias endofíticas e sua relação com a planta hospedeira, promoveu-se o isolamento de bactérias contaminantes de explantes de cinco diferentes variedades de cana-de-açúcar: RB98710, RB034068, RB034130, RB034120 e RB034041 visando à determinação de características morfológicas e fisiológicas. Os treze isolados obtidos possuem diversidade para características morfo-tintoriais e bioquímicas sendo caracterizados como bastonetes gram-positivos. Apresentaram capacidade de produção de fatores de crescimento vegetal e, após teste de sensibilidade a antimicrobianos, dois antibióticos: Ciprofloxacino e Ceftazidima apresentaram maior potencial de controle do crescimento dos isolados. Com as contaminações microbianas controladas, estudos foram realizados para avaliar o efeito de reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de culturas de ápices caulinares e seu enraizamento em três variedades de cana: RB98710, RB034041 e RB034130. Utilizou-se meio MS líquido contendo BAP, KIN, ANA e GA₃ em diferentes combinações e concentrações. Os resultados mostraram que, para as três variedades testadas, o meio MS com 0,2 mg.L⁻¹ de BAP e 0,1 mg.L⁻¹ de KIN são os mais apropriados para a maior produção de brotos e que os melhores resultados de enraizamento foram obtidos em meio ½ MS semissólido com 6% de sacarose, 5,0 mg.L⁻¹ de ANA e 0,2% de carvão ativado. As plântulas foram aclimatizadas e a capacidade de sobrevivência sob condições *ex vitro* foi de 90%, três semanas após a transferência para a casa de vegetação.

Palavras-chave: micropropagação, diversidade bacteriana, antibióticos.

² Orientador: Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov. EA/UFG.

ABSTRACT

FARIA, P. R. **Isolation of endophytic bacteria and *in vitro* establishment of different genotypes of sugarcane.** 2012. 85 f. Dissertation (Master in Genetic and Plant Breeding) – College of Agronomy, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.³

In micropropagation, plant tissue fragments called explants are isolated aseptically, disinfected and cultured in culture medium. However, oxidation and contamination are the main problems in the initiation of the tissue culture plants. In order to initiate the establishment of *in vitro* methodologies for selected sugarcane varieties a series of decontaminating treatments were performed in shoot tips with different exposure times and concentrations of sodium hypochlorite, casugamicin, ethanol and mercuric chloride. There were no problems with oxidation in any treatment. The use of reagent concentrations and times tested showed not be phytotoxic. Treatment using longer times of exposure to casugamicin and sodium hypochlorite obtained the lowest levels of contamination by fungi and bacteria. However, bacterial contamination rates were high which indicates the necessity of using new procedures for the decontamination process. It is known that the sugarcane is associated with different endophytic bacteria. In order to better study these endophytic bacteria and their relationship with the host plant, promoted the isolation of bacteria in explants of five different varieties of sugarcane: RB98710, RB34068, RB034130, RB034120 and RB034041 to determinate of morphological and physiological characteristics. The thirteen isolates have diversity for morphological and biochemical staining and are characterized as gram-positive. All of them had a production capacity of plant growth factors, and after antimicrobial susceptibility testing, two antibiotics: Ciprofloxacin and Ceftazidime showed the greatest potential for controlling the growth of the isolates. With microbial contamination controlled, studies were conducted to evaluate the effect of growth regulators on *in vitro* multiplication of shoot tip culture and its roots in three sugarcane varieties: RB98710, RB034041 and RB034130. We used liquid MS medium containing BAP, KIN, NAA and GA₃ in different combinations and concentrations. The results showed that, for the three varieties tested, MS medium with 0.2 mg.L⁻¹ BAP and 0.1 mg L⁻¹ KIN are most suitable for higher production of shoots and that the best rooting results were obtained in semi-solid ½ MS medium with 6% sucrose, 5.0 mg L⁻¹ NAA and 0.2% activated charcoal. The plantlets were acclimatized and survivability under *ex vitro* conditions was 90%, three weeks after the transfer to the greenhouse.

Key words: micropropagation, bacterial diversity, antibiotics.

³ Adviser: Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov. EA-UFG.

1 INTRODUÇÃO GERAL

A cana-de-açúcar é uma planta com elevado potencial para transformar energia solar em energia química, representada principalmente pela sacarose. O elevado teor deste nutriente na planta madura faz da cana uma importante fonte energética renovável. Graças à sua múltipla utilidade, a cana pode ser empregada *in natura*, sob a forma de forragem, para alimentação animal, ou como matéria-prima para a fabricação de açúcar, etanol, melado, rapadura, aguardente entre outros (Oliveira et al., 2009). Seus resíduos também apresentam importância econômica: o vinhoto pode ser utilizado como adubo orgânico (Alvarenga & Queiroz, 2009) e o bagaço tornou-se uma alternativa para diversificação da matriz energética permitindo a comercialização de eletricidade e de créditos de carbono (João, 2009).

O etanol é reconhecido na comunidade internacional como uma das formas renováveis de energia mais viáveis atualmente, além de ser uma solução possível frente aos problemas ambientais causados pelos combustíveis de origem fóssil. Destaca-se, sobretudo, como um dos melhores candidatos a receber apoio em políticas de financiamento (Mecanismos de Desenvolvimento Limpo – MDL), segundo o estabelecido pelo Protocolo de Quioto (Leite, 1997).

Em decorrência da posição de destaque que ocupa na economia mundial, a cultura da cana-de-açúcar está sendo cada vez mais inserida em programas de melhoramento, visando à introdução de características de interesse agrônomo, tais como: rápida multiplicação; maior resistência à seca, pragas e patógenos; tolerância a herbicidas, aumento do teor de sacarose, etc. As pesquisas na área de melhoramento são necessárias uma vez que as variedades, depois de algum tempo de reprodução vegetativa, ainda por processos pouco explicados, entram em degenerescência, perdendo o vigor e a produtividade e, ainda, adquirindo um aumento de suscetibilidade às principais pragas e doenças (Kerbaudy, 1997).

Donato et al. (2005) relatam que em programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar, a propagação *in vitro* é bastante vantajosa, considerando que há necessidade de multiplicar o material selecionado com rapidez. Além dos 10 ou 15 anos de

seleção, eram requeridos mais alguns anos para se estabelecer as novas cultivares em plantios comerciais. A propagação *in vitro* é uma alternativa ao processo convencional de propagação vegetativa por meio de colmos. Altas taxas de multiplicação de cana-de-açúcar podem ser alcançadas por esse método, com inúmeras vantagens em relação à multiplicação em campo, como a produção de grande quantidade de mudas de qualidade superior, em tempo e espaço reduzidos.

Na cultura de tecidos, pequenos fragmentos de tecido vivo, chamados explantes, são isolados de um organismo vegetal, desinfestados e cultivados assepticamente, por períodos indefinidos em um meio de cultura apropriado. O objetivo é obter uma nova planta idêntica à original, ou seja, realizar uma clonagem vegetal que é definida como uma propagação assexuada de células ou organismos, de modo a obter novo indivíduo, mantendo-se o genótipo idêntico aquele do ancestral comum. O material então regenerado poderá ser submetido a diversos testes, a fim de se verificar em quais condições se desenvolve melhor (Andrade et al., 2002).

A micropropagação que envolve a obtenção de embrióides via embriogênese somática, como já é feito com algumas culturas, especialmente fruteiras, pode auxiliar no melhoramento genético de plantas, reduzindo o tempo para a obtenção de cultivares (Carvalho et al., 2006).

Para que variedades sejam micropropagadas eficientemente faz-se necessário, primeiramente, o estabelecimento de condições ideais de cultivo *in vitro* para o material em estudo. Donato et al. (2005) relatam que um dos problemas conhecidos em cultura de tecidos de plantas é a contaminação por micro-organismos, especialmente, em espécies tropicais. Pereira et al. (2003) ressaltam que embora seus efeitos sejam pouco conhecidos, a presença destes micro-organismos sob condições *in vitro*, constitui-se numa das mais importantes causas de perda de material vegetal em laboratório.

A cultura de tecidos se constitui numa poderosa ferramenta para o melhorista, podendo ser empregada de diferentes maneiras em um programa de melhoramento vegetal, oferecendo soluções exclusivas nas diferentes fases do processo, entretanto requer o estabelecimento de protocolos de micropropagação, ou seja, a descrição de técnicas que forneçam as condições apropriadas ao crescimento e desenvolvimento de uma variedade em laboratório.

Cidade et al. (2006), discorrem que os protocolos de micropropagação são ferramentas fundamentais na utilização de técnicas de transformação genética, que

oferecem novas possibilidades para a obtenção de novas variedades com características de interesse.

Não se verifica, porém, protocolos de micropropagação eficientes para as variedades de cana-de-açúcar cultivadas no Estado de Goiás e, em função desta precariedade de informações, este trabalho tem como objetivo o estudo e desenvolvimento de protocolos de descontaminação de explantes e estabelecimento de protocolos de propagação *in vitro* de variedades de cana-de-açúcar, que se tornarão ferramentas úteis para o programa de melhoramento genético desenvolvido na UFG.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum sp*)

2.1.1 Origem da Cana-de-açúcar

A teoria mais aceita de sua origem considera que a cana seja nativa das ilhas do Arquipélago da Polinésia, sendo *Saccharum robustum* uma espécie botânica que se originou no centro de expansão da Nova Guiné. Segundo Miocque (1993), nas Américas a cana-de-açúcar foi introduzida na segunda expedição de Cristóvão Colombo, em 1493. No Brasil as primeiras mudas foram introduzidas em 1502, proveniente da Ilha da Madeira, por Martim Afonso de Souza.

2.1.2 Classificação botânica

A cana-de-açúcar é uma espécie pertencente ao gênero *Saccharum*, da família Poaceae, é uma planta tropical de metabolismo C₄, que cresce bem em temperaturas acima de 25°C, em solos férteis e bem drenados (Lemos et al., 2002). Cesnik & Miocque (2004) relatam que em 1753, Linneu descreveu a cana-de-açúcar em seu livro *Species Plantarum* e a classificou como *Saccharum officinarum* e *Saccharum spicatum*. Os autores relatam também que inúmeras modificações aconteceram e que atualmente a classificação aceita é divisão: Embryophyta siphonogama, subdivisão: Angiospermae, classe: Monocotyledoneae, ordem: Glumifloreae, família: Poaceae, tribo: Andropogoneae, subtribo: Sacchareae, gênero: *Saccharum*.

2.1.3 Histórico da cana-de-açúcar no mundo

Machado (2000) afirma que a cana-de-açúcar até o século XVIII, foi considerada planta medicinal e até mesmo artigo de luxo. Sua crescente valorização como

adoçante iniciou-se com o antigo costume de adoçar chá, café e chocolate. Porém as suas qualidades como adoçante são relatadas mesmo antes de Cristo, quando o homem já a conhecia como “algo que produzia mel sem o auxílio das abelhas” e que “uma bebida embriagante” podia ser fabricada a partir de seu caldo (Cesnik & Miocque, 2004).

2.1.4 Histórico da Cana-de-açúcar no Brasil

Entre os anos de 1500 e 1900, a cultura da cana-de-açúcar se desenvolveu muito no Brasil, desde a implantação dos primeiros engenhos à introdução de variedades melhoradas. Os Estados de São Paulo, Bahia, Pernambuco, Rio de Janeiro e Alagoas foram os pioneiros no desenvolvimento da agroindústria canavieira (Cesnik & Miocque, 2004). No início do século XX, uma crise econômica mostrou a necessidade de organizar a experimentação canavieira no Brasil. Diversas “conferências açucareiras” foram convocadas e, a partir de então, programas de melhoramento e estações experimentais foram implantados no Nordeste e no Sudeste (Machado, 2000).

Diversas Universidades e Cooperativas empenharam-se na busca por melhorias da produção da cana e do rendimento do açúcar e do álcool. Em 1968, a Cooperativa Central dos Produtores de Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo - Coopersucar - deu início a um importante programa de melhoramento genético da cana-de-açúcar, incorporando a Cooperativa dos Usineiros do Oeste do Estado de São Paulo - Copereste - à sua estação experimental. Na década de 1970, também foram criados o Instituto do Açúcar e do Álcool - IAA - e o Plano Nacional de Melhoramento da Cana-de-açúcar - Planalsucar, com abrangência nacional e que muito colaboraram para o desenvolvimento científico e econômico (Miocque, 1993).

A partir da década de 70 até os dias atuais, a cultura da cana-de-açúcar enfrentou dificuldades econômicas e políticas, passando por fases de “altos e baixos” ao longo dos anos. O Proálcool, Programa Nacional do Álcool, criado em 1975/76, teve seu auge no ano de 1985, quando 96% da frota brasileira de automóveis era movida a etanol. As safras entre os anos de 1991 a 1996 fizeram com que a produção de etanol anidro atingisse 12,3 milhões de m³/ano, mas, posteriormente o programa foi abandonado fazendo com que a produção de etanol e o incentivo ao cultivo da cana-de-açúcar declinassem consideravelmente (Zucchi et al., 2002).

Nos últimos anos, as mudanças climáticas, a conscientização de que o petróleo é uma fonte esgotável e diversos interesses econômicos e políticos, voltam a incentivar a indústria sucroenergética. De acordo com a Agrianual (2006), a produção de etanol, tanto etílico como anidro, apresentou um crescimento de cerca de 70% em 2007/2008, o que permitiu totalizar nas próximas safras 18,5 bilhões de litros aproximadamente. O crescimento da demanda do produto deveu-se ao forte aumento das vendas de veículos *flex fuel* (bicombustível) que ultrapassaram as metas do setor (que eram de 45% do total de carros vendidos em 2005), atingindo a marca de 60% do total de veículos de passeio vendidos nos últimos dois anos.

Em função de características, tais como: clima e relevo, ampla área agricultável e localização favorável ao escoamento da produção o Estado de Goiás apresenta-se como um dos estados-alvo para receber investimentos do setor canavieiro, que além de estimular a expansão da área cultivada de cana-de-açúcar, também promoverão um considerável aumento da implantação de novas usinas e de grandes investimentos em pesquisas (Carrijo & Miziara, 2009).

2.1.5 A cana-de-açúcar no contexto econômico mundial

Segundo a FAO (2012), dados de 2005 colocam o Brasil na liderança da lista de 80 países produtores de cana, responsável por 25% da produção mundial, seguido pela Índia, China, Tailândia, Paquistão e México. Para o período o complexo sucroenergético Brasileiro gerou uma renda de US\$ 7 bilhões, sendo que US\$ 3,2 bilhões são obtidos em vendas para o exterior, a cana-de-açúcar é a base para este ramo do agronegócio, representado por 350 indústrias de açúcar e etanol e um milhão de empregos diretos e indiretos (IBGE, 2012).

2.1.6 A cana-de-açúcar no contexto econômico nacional

Dados da Conab (2012) revelam que no Brasil a área de cana destinada à atividade sucroenergética, na safra do ano agrícola 2012/13, está estimada em 8,567 milhões de hectares, distribuída em todos os estados produtores. O Estado de São Paulo é o maior produtor com 51,66% (4,426 milhões de hectares) seguido por Minas Gerais com 8,97% (768,64 mil hectares), Goiás com 8,54% (732,02 mil hectares), Paraná com 7,17%

(614,01 mil hectares), Mato Grosso do Sul com 6,31% (540,97 mil hectares), Alagoas com 5,35% (458,098 mil hectares) e Pernambuco com 3,48% (398,39 mil hectares). Nos demais estados produtores as áreas são menores, com representações abaixo de 3% mas com bons índices de produtividade.

2.1.7 A cana-de-açúcar no contexto econômico Goiano

Dados da Conab (2012) permitem estimar para o Estado de Goiás, na safra 2010/2011 um volume aproximado de 48.032 milhões de toneladas de cana-de-açúcar e 2.004 milhões de toneladas de açúcar e 2.773.479 bilhões de litros de etanol, dos quais 788.117 milhões de etanol anidro (para mistura na gasolina) 1.985.361 bilhões de litros de etanol hidratado (combustível). Dados da Conab/Sureg-GO (2011) revelam que o Estado possui 37 usinas de açúcar e etanol em operação. A Secretaria de Estado de Gestão e Planejamento do Estado de Goiás (SEGPLAN-GO, 2011) registra 16 projetos de instalação e quatro de expansão.

2.2 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

2.2.1 Definição

A cultura de tecidos vegetais pode ser definida como um conjunto de técnicas para favorecer o crescimento de células, tecidos e órgãos em um ambiente estéril e controlado. O aspecto mais relevante da cultura de tecidos está na área de multiplicação de plantas, conhecida como micropropagação ou propagação clonal, pois os indivíduos produzidos são geneticamente idênticos (Raven et al., 2001).

Na cultura de tecidos, pequenos fragmentos de tecido vivo, chamados explantes, são isolados de um organismo vegetal, desinfestados e cultivados assepticamente, por períodos indefinidos em um meio de cultura apropriado. O objetivo é obter uma nova planta idêntica à original, ou seja, realizar uma clonagem vegetal que é definida como uma propagação assexuada de células ou organismos, de modo a obter novo indivíduo, mantendo-se o genótipo idêntico aquele do ancestral comum. O material então regenerado poderá ser submetido a diversos testes, a fim de se verificar em quais condições se desenvolve melhor (Carvalho et al., 2002).

2.2.2 Etapas do cultivo *in vitro*

A primeira etapa do processo de micropropagação é o cultivo do explante *in vitro* com concentrações controladas de reguladores de crescimento (Lee, 1987). A origem e a sanidade das matrizes a serem multiplicadas, devem ser cuidadosamente controladas. O genótipo (matriz utilizada), a fonte de explante (raiz, caule, folhas, etc.) e a condição de cultivo (luz, temperatura, meio de cultura, vasilhame) constituem fatores capazes de exercer grande influência sobre o processo de regeneração dos explantes. O sucesso da regeneração da fonte de explante utilizada depende da decisão correta no estabelecimento de todos esses fatores, assim como, da combinação ótima dos três para que o processo seja bem sucedido (Caldas et al., 1998).

2.2.3 O crescimento *in vitro*

Para Cordeiro et al. (2002), a regeneração é fundamentada na capacidade de proliferação das células vegetais organizarem-se em tecidos e, posteriormente, em novas plantas. Essa capacidade é denominada totipotência. Considera-se que as células vegetais manifestem, em momentos diferentes e sob estímulos apropriados, a possibilidade de desenvolver um novo indivíduo.

As condições da cultura, principalmente o meio de cultura, são essenciais para que haja um bom crescimento vegetativo, além de um índice de multiplicação adequado. O meio de cultura é constituído de sais minerais (micro e macronutrientes), nitrogênio reduzido, uma fonte de carbono, vitaminas e reguladores de crescimento necessários para manter a divisão celular e a proliferação dos explantes. A combinação adequada entre esses componentes, associada às demais condições da cultura, como luz (intensidade, qualidade e fotoperíodo), temperatura e vasilhame da cultura formam a base da tecnologia da cultura de tecidos vegetais (Kerbaudy, 1997; Andrade et al., 2002).

A fonte de explante é fator decisivo no sucesso da regeneração *in vitro*, pois a capacidade de regeneração depende da idade, do estado fisiológico e do tecido utilizado. Em geral, tecidos jovens e em crescimento como, por exemplo, os meristemas, são utilizados como fontes de explante (Liu, 1984).

É válido ressaltar que variedades de uma mesma espécie podem apresentar respostas diferentes às condições de cultivo. No entanto, toda cultivar é capaz de responder

às condições de cultura *in vitro*, desde que seja utilizada uma combinação correta dos fatores que alteram a regeneração *in vitro* (Mantell et al., 1994).

2.2.4 Meio de cultura

Para Guerra & Nodari (2006) Meios de cultivo são combinações de sais minerais (macro e micronutrientes), carboidratos, vitaminas e reguladores de crescimento, que podem ser sólidos (adicionando-se ágar ou outro agente geleificante) ou líquidos, de acordo com o protocolo para o sistema de cultivo.

Os meios nutritivos tem a função de fornecer substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e, controlar em grande parte o padrão de desenvolvimento *in vitro*. Para isso devem os meios necessitam ser definidos, preparados a partir de sais com qualidade analítica e formulação controlada, possibilitando a reprodução dos resultados em qualquer época ou lugar (Caldas et al., 1998).

Existem diversas formulações de meio de cultura, porém o mais utilizado para culturas de tecidos vegetais é o meio “MS”, descrito por Murashige e Skoog (1962). O elemento chave deste meio nutritivo é a presença de alta concentração de nitrogênio na forma de nitrato de amônio, que tem se mostrado benéfico para a indução de organogênese *in vitro* em várias espécies de plantas (Murashige & Skoog, 1962; Donato et al., 1999).

A composição do meio de cultura “MS” pode ser adaptada ou alterada, e tem como base uma combinação de: água, macronutrientes, micronutrientes, carboidratos, vitaminas, mio inositol e reguladores de crescimento. Outros aditivos também podem se adicionados o meio como: antibióticos, fungicidas, carvão ativado, agentes solidificantes tais como ágar, *gelrite*® *phyta-gel*®, entre outros (Caldas et al., 1998).

2.2.5 Vantagens da micropropagação

Além da multiplicação de material genético, troca e avaliação de germoplasmas e da obtenção de mudas livres de patógenos, a cultura de tecidos também se estende ao aumento da variabilidade genética. Sob certas condições de cultura, observa-se a produção de plantas não totalmente idênticas à planta matriz os chamados variantes somaclonais (Silvarolla, 1992).

Plantas regeneradas a partir da cultura de tecidos constituem, portanto, alternativas viáveis para variedades melhoradas e para aumento da produção (Falco et al., 1996). Este processo demonstra eficiência na rápida multiplicação de uma variedade nova com características promissoras, superiores às existentes em lavouras comerciais, além de amenizar perdas garantindo lucratividade da colheita.

Macedo et al. (2007) ressaltam que as técnicas de cultivo *in vitro*, como a embriogênese somática, e a transformação genética apresentam grande potencial de aplicação em programas de melhoramento genético em cana-de-açúcar. Para o autor a indução de calos embriogênicos é uma etapa determinante, influenciando diretamente na capacidade de obtenção de embriões somáticos de cana-de-açúcar e a regeneração de plantas.

Na embriogênese somática há formação de estruturas semelhantes aos embriões zigóticos, a partir de células somáticas proporcionando a oportunidade de propagação clonal de plantas férteis e geneticamente selecionadas além da multiplicação de plantas geneticamente modificadas (Carvalho et al., 2006).

2.2.6 Cultura de Tecidos em Cana-de-açúcar

Os primeiros estudos sobre micropropagação em cana-de-açúcar surgiram na década de 60, Lemos (2009) registra que foi a partir dos trabalhos de Nickell (1964) com indução de raízes em calos que a cultura de tecidos em cana-de-açúcar se desenvolveu. O autor relata que Barba & Nickell (1969) e Heinz & Mee (1969) anunciaram de forma independente a regeneração de plantas a partir de calos. Macedo (2010) cita que LIU (1983) regenerou plântulas a partir de calos e posteriormente, Ho & Vasil (1983) obtiveram embriões somáticos a partir de calos. Nos anos seguintes diversos trabalhos foram realizados em diferentes áreas da micropropagação em cana como protocolos para a regeneração *in vitro* tendo como base processos de organogênese e embriogênese somática (Taylor & Dukic, 1993). Lemos (2009) cita o trabalho de (Wagih et al., 1995) sobre produção de plantas livres de patógenos sistêmicos. Arencibia et al. (1998) realizaram transformação genética em cana-de-açúcar. Trabalhos envolvendo a potencialização e regeneração de calos por diferentes hormônios vegetais foram desenvolvidos por Chengalrayan & Gallo-Meagher, (2001); Macedo (2010). Donato et al. (2005) testou protocolos associados a antibióticos e fungicidas visando controle de endofíticos.

Cidade et al. (2006) relata que diferentes métodos de transformação genética de cana-de-açúcar foram desenvolvidos nos últimos anos, a autora ressalta a contribuição significativa destes métodos para a produção de novas variedades e cita transformações com a utilização de *Agrobacterium tumefaciens* (Enríquez-Obregón et al., 1997).

2.3 MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS

2.3.1 Definições

Souza (2011) verificou que micro-organismos endofíticos têm sido isolados de raízes, nódulos, caule, folhas e frutos em uma extensa variedade de plantas, incluindo muitas de interesse agrícola, tais como, cana-de-açúcar (Cavalcante & Döbereiner, 1988), milho (Araujo et al., 2000), videira (Bell et al., 1995), algodão (Quadt-Hallmann et al., 1997), arroz (Stolzfus et al., 1997), tomate (Pillay & Nowak, 1997), citros (Marcon, 2002), batata (Reiter et al., 2003), trigo e sorgo (Zinniel et al., 2002), entre outras.

Kneifel & Leonhardt (1992) citam que a contaminação por micro-organismos é conhecida como um dos mais sérios problemas da cultura de tecidos de plantas, especialmente, em espécies tropicais. Nos laboratórios de cultura de tecidos a presença de micro-organismos é normalmente considerada contaminação, sendo procedimento de rotina o descarte imediato dos indivíduos que apresentem algum sinal da presença de micro-organismos. Costa et al. (2010) relata que este procedimento parte do princípio que, em geral, os micro-organismos são passíveis de patogenicidade, pressupondo a possibilidade de ocorrência de uma doença contagiosa adota-se, dessa forma, o princípio da erradicação parcial ou total da cultura como medida de controle.

Trigiano (2010) relata que os endofíticos são representados principalmente por fungos e bactérias que se desenvolvem no interior dos tecidos vegetais, sem causar danos aparentes. Para o autor, endofíticos são micro-organismos que crescem no interior das plantas, com capacidade de viver toda ou a maior parte dos seus ciclos de vida em associação próxima com a mesma, esta associação é caracterizada como simbiote mutualística, pois pode proporcionar ao hospedeiro variados benefícios, como: aumento da nutrição, tolerância à seca, resistência a algumas doenças.

Estudos mais detalhados revelaram que tanto *Acetobacter. diazotrophicus* (James et al., 1994), como *Herbaspirillum* spp. (Olivares et al., 1997) encontram-se

internamente na planta colonizada, localizando-se nos tecidos vasculares e espaços intercelulares.

O estabelecimento das plantas em seus respectivos *habitats* envolve a sua capacidade em interagir com diferentes espécies de seres vivos (Peixoto Neto et al., 2002). Esta interação visa obter os recursos necessários a sobrevivência, assim os seres vivos relacionam entre si e com o ambiente físico (Costa et al., 2010). O estado normal das plantas também é o de coexistir com uma ampla gama de micro-organismos externos e internos, presentes em seus diversos órgãos seja de maneira simbiote ou não. Saikkonen et al. (2000), citado por Costa et al. (2010), estimam que 90% das espécies vegetais apresentam algum tipo de associação simbiótica com micro-organismos como os rizóbios, micorrizas, rizobactérias e as diazotróficas. Segundo os autores, benefícios recíprocos foram desenvolvidos como melhor crescimento, reprodução e resistência a estresses bióticos e abióticos, por parte das plantas, e local de refugio, nutrição, e favorecimento da disseminação, por parte dos micro-organismos.

Micro-organismos endofíticos apresentam uma relação simbiótica e em equilíbrio com o vegetal na natureza. Porém, uma vez isolado o explante e introduzido em meio de cultura, as condições *in vitro* favorecem o crescimento do micro-organismo, localizado internamente no tecido vegetal, prejudicando o desenvolvimento do explante (Peixoto Neto et al., 2002). As bactérias endofíticas são responsáveis pela maioria das contaminações, que são indesejáveis, porém há casos onde o cultivo associado pode se tornar uma boa opção, pois a bactéria é identificada pode não ser patogênica (Grattapaglia e Machado, 1998).

Segundo Souza (2011) o aumento de informações sobre interação microrganismos / plantas e a determinação das diferentes funções destes no interior dos vegetais, proporcionou maior atenção ao seu estudo. Pesquisas apontam que estes micro-organismos podem atuar no controle biológico de inúmeras doenças, na promoção de crescimento vegetal (Hallmann et al., 1997; Hallmann & Berg, 2006; Ryan et al., 2008) e na biorremediação de áreas poluídas (Newman & Reynolds, 2005; Germaine et al., 2009).

2.3.2 Endofíticos em cana-de-açúcar

Milani (2009) comenta a ocorrência de vários micro-organismos associados às diversas culturas, colonizando várias partes da planta. O autor ressalta que das as bactérias

rizosféricas o gênero mais observado é o *Azospirillum*, com relação às endofíticas, uma das mais estudadas pertence ao gênero *Gluconacetobacter* com ocorrência em cana-de-açúcar.

Donato et al. (1999) afirma que a cana-de-açúcar está associada à bactérias fixadoras de nitrogênio. Entre essas bactérias, *Acetobacter diazotrophicus* (Gillis et al., 1989) e *Herbaspirillum* spp. (Baldani et al. 1996; Gillis et al., 1991) têm sido consideradas as mais importantes pelo seu caráter endofítico obrigatório (Baldani et al., 1997). Reis Junior (2000), isolou *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasiliense*, *Azospirillum amazonense*, *Acetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp. em cana-de-açúcar, e observou que a maior frequência de isolados ocorreu nas raízes, seguida dos colmos e folhas respectivamente.

Mendes (2008) relata que a comunidade bacteriana endofítica associada à cana-de-açúcar é constituída por múltiplos gêneros e que apresentam potencial para promoção do crescimento vegetal e controle de doenças, em seu trabalho a maioria das bactérias endofíticas isoladas pertencem ao gênero *Burkholderia*.

Santos (2012) estudou 30 bactérias diazotróficas, endofíticas de raiz e da rizosfera de plantas de cana soca, e observou que 27 destes isolados foram capazes de solubilizar fosfato inorgânico *in vitro*. Grant et al., (2001) destaca que a cana-de-açúcar possui a característica de ser uma grande extratora de nutrientes do solo, principalmente de fósforo.

2.3.3 Descontaminação

O controle das contaminações no cultivo de explantes vegetais *in vitro* está associado a cuidados básicos como: esterilização adequada dos equipamentos, meios de cultura e do material vegetal, técnicas básicas de assepsia do manipulador e do ambiente (Long et al., 1988; Leifert & Woodward, 1998; Pereira et al., 2003).

Estes procedimentos muitas vezes não são suficientes para controlar as contaminações por diversos fatores. Entretanto, um grupo de contaminantes vem se destacando em trabalhos recentes, os micro-organismos endofíticos e são considerados problemáticos para o cultivo de plantas *in vitro* (Leifert & Woodward, 1998; Long et al., 1988; Pereira et al., 2003; Reed et al., 1998).

O etanol e compostos à base de cloro são as substâncias com ação germicidas utilizadas nos processos de desinfestação em cana-de-açúcar. Dentre as várias substâncias

germicidas à base de cloro, utilizadas para desinfestação dos explantes, as mais comuns são o hipoclorito de sódio ou o hipoclorito de cálcio. As concentrações mais comuns vão de 0,5 a 2,0 % de cloro ativo e o tratamento pode durar até 40 minutos (Câmara, 2010).

A concentração do produto desinfestante e o tempo de imersão no tratamento de descontaminação dependem principalmente do tipo de tecido, pois a super exposição do tecido aos agentes esterilizantes, geralmente, danifica o explante e leva à morte celular (Smith, 2000). Tecidos muito frágeis, como folhas jovens, devem ser tratados em baixas concentrações e tempo reduzido. Materiais adultos provenientes do campo devem imersos em concentrações mais altas e por tempo mais prolongado (Souza et al., 2006).

2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira**. Instituto FNP Consultoria e Agroinformativos. São Paulo, p. 227-248, 2006.

ALVARENGA, R. P.; QUEIROZ, T. R. Cleaner Production and Environmental Aspects in Sugar-alcohol Industries. In: 2nd International Workshop Advances in Cleaner Production. São Paulo – Brazil. **Resumos**. São Paulo: UNIP, p. 217-219, 2009.

ANDRADE, S. R. M. Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento – Documentos / Embrapa Cerrados**. 1. ed. Planaltina-DF, n. 58, p.16, 2002.

ARAÚJO, J. M.; SILVA, A. C.; AZEVEDO, J. L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.) Brazilian Archives of Biology and Technology, v.43, p.447-451. 2000.

ARENCIBIA, A. D.; CARMONA, E. R.; TÉLLEZ, P.; CHAN, M. T.; YU, S. M.; TRUJILLO, LE; ORAMAS, P. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Transgenic research**, v. 7, p. 213-222, 1998.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. D. L.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 911-92, 1997.

BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSÉN, E.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF Group 1) as species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 802-810, 1996.

BARBA, R. C. & NICKELL, L.G. **Rapid multiplication of sugarcane by tissue culture**, Planta 89:199 – 202. 1969.

BELL, C.R.; DICKIE, G.A; HARVEY, W.L.G.; CHAN, J.W.Y.F. Entophytic bacteria in grapevine. **Canadian Journal Microbiology**, v. 41, p.46-53. 1995.

CALDAS, L. S.; HARIDASSAN, P. FERREIRA, M. E.; Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, v. 1, p. 87-116, 1998.

CAMARA, T. R.; WILLADINO, L.; ALBUQUERQUE, C. C. Microrganismos assintomáticos do cultivo in vitro: natureza e riscos para o cultivo de plantas. In: SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E (Ed.). **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Embrapa Informação Tecnológica, v. 1, cap. 5, p. 221-260. Brasília 2010.

CARRIJO, L. O.; MIZIARA, F. A expansão do setor sucroalcooleiro como uma nova etapa da fronteira agrícola em Goiás: Estudo de caso no Município de Mineiros. **Revista de Economia da UEG**, Anápolis, v. 05, n. 02, p. 92-110 jul-dez. 2009.

CARVALHO, C. P. das S.; CORREIA, D.; BENDADIS, A. K.; LUZ, J. M. Q.; ROSSETTI, A. G. In vitro culture of spondias mombim L. natal segments. *Revista Brasileira de fruticultura*, v. 24, n. 3, 2002.

CARVALHO, J. M. F. C.; LIMA, M. M. DE A.; AIRES, P. S. R.; VIDAL, M. S.; PIMENTEL, N. W. **Embriogênese somática**. Embrapa Algodão. Campina Grande, n. 152, 35 p, 2006.

CAVALCANTE, V. A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, The Hague, v. 108, p. 23-31, 1988.

CESNIK, R.; MIOCQUE, J. **Melhoramento da cana-de-açúcar**. Embrapa Informações tecnológicas, Brasília, 2004, 307 p.

CHENGALRAYAN, K. & GALLO-MEAGHER, M. **Effect of various growth regulators on shoot regeneration of sugarcane**. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* Plant 37:434-439. 2001.

CIDADE, D. A. P.; GARCIA, R. O.; DUARTE, A. C.; MARTINS, G. S.; MANSUR, E. Morfogênese *in vitro* de variedades brasileiras de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 3, p. 385-391. Brasília, 2006.

CONAB/SUREG-GO; **Avaliação da Safra de cana-de-açúcar 2011/2012** – Segundo levantamento de Goiás, agosto/2011 13 p. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_09_26_17_16_08_conjuntura_cana-de-acucar.pdf>. Acesso em: 22 mai. 2012.

CONAB; **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar**, terceiro levantamento, dezembro/2011 - Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília: Conab 2011.

Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_12_08_11_00_54_08.pdf>. Acesso em: 22 mai. 2012.

CORDEIRO, M. C. R.; CID, L. P. B.; PINTO, A. C. Q.; GOMES, A. C.; ANDRADE, S. R. M.; RAMOS, V. H. V. Ensaio preliminares para o estabelecimento de um protocolo de assepsia, visando a micropropagação de cultivares de mangueira. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Cerrados**, Planaltina-DF, n. 43, 2002.

COSTA, M. G. C.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; OTONI, W. C. Importância das contaminações e dos microrganismos endêmicos na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. In: SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. (Ed.) **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, Brasília 2010. v. 1, cap. 1, p. 17-89, 2010.

DONATO, V. M. T. S.; ANDRADE, A. G.; CÂMARA, T. R. Variedades de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* com diferentes fontes de nitrogênio. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 56, n. 4, p. 1289-1292, out/dez. 1999.

DONATO, V. M. T. S.; ANDRADE, A. G.; TAKAKI, G. M. C.; MARIANO, R. L. R.; MACIEL, G. A. Plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* com antibióticos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 134-141, jan./fev. 2005.

ENRÍQUEZ-OBREGÓN, G.A.; VÁZQUEZ-PADRÓN, R.I.; PRIETO-SAMSÓNOV, D.L.; PEREZ, M.; SELMAN-HOUSSEIN, G. Genetic transformation of sugarcane by *Agrobacterium tumefaciens* using antioxidant compounds. **Biotechnologia Aplicada**, v.14, p.169-174, 1997.

FALCO, M C.; MENDES, B. M. J.; TULMANN NETO, A.; GLORIA, B. A. Histological characterization of *in vitro* regeneration of *Saccharum sp.* **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8, n. 2, p. 93-97, 1996.

FAO; Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. Disponível em: <<http://www.fao.org/es/ess/top/commodity.html?lang=en&item=156&year=2005>>. Acesso em: 15 abr. 2012.

GERMAINE, K.J.; KEOGH, E.; RYAN, D.; DOWLING, D.N. Bacteriana naftaleno phytoprotection e fitorremediação mediada pelo endófito. **FEMS Microbiol Lett** 296: 226-23. 2009.

GILLIS, M.; DÖBEREINER, J.; POT, B.; GOOR, M.; FALSEN, E.; HOSTE, B. E.; KERSTERS, K. Taxonomy relationship between *Pseudomonas rubrisubalbicans*, some clinical isolates (EF group I), *Herbaspirillum seropedicae* and *Aquaspirillum autotrophicum*. In: POLSINELLI, M.; MATERASSI, R.; VICENZINI, M. (Ed.). Nitrogen fixation. **Development in Plant and Soil Sciences**. Dordrecht: Academic Publishers, v. 48, p. 292-294. 1991.

GILLIS, M.; KERSTERS, K.; HOSTE, B.; JANSSENS, D.; KROPPESTEDT, R. M.; STEPHAN, M. P.; TEIXEIRA, K. R.S.; DOBEREINER, J. DE LEY J. *Acetobacter*

diazotrophicus sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. **Intenacional Journal of Systematic Bacteriology**, v. 39, n. 3, p. 361-364, 1989.

GRANT, C. A.; FLATEN, D. N.; TOMASIEWICZ, D. J.; SHEPPARD, S. C. A importância do fósforo no desenvolvimento inicial da planta. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, v. 95, p. 1-6, 2001.

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

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Introdução ao conceito de Biotecnologia**. Apostila de biotecnologia - CCA/UFSC Edição da Steinmacher LFDGV / UFSC. Florianópolis. v. 1, 41 p., 2006.

HALLMANN, J.; BERG, G. **Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes** *Microbial root endophytes*, vol.9, eds Schulz BJE, Boyle CJC, Sieber TN, editors. (Berlim, Heidelberg: Springer), 15-31. 2006.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.895-914, 1997.

HEINZ, D. J & MEE, G.W.P. **Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species**. Crop Sci. 9: p346. 1969.

HIGLEY, P.; ISHIMARU, C. A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R. G.;VIDAVER, A. K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.2198-2208, 2002.

HO, J. & VASIL, I.K. **Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum*)**. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny somatic embryos. Protoplasma 118:169-180. 1983.

IBGE; **Estatística/indicadores/indústria/agro**, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/industria/pimpfagronova/default.shtm>>. Acesso em: 26 mar. 2012.

JAMES, E.K.; REIS, V.M. OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus* **Journal of Experimental Botany**, v.45, p.757-766, 1994.

JOÃO, I. S. Impacto Ambiental e Gestão de Resíduos na Agroindústria Canavieira: o Caso do Aproveitamento do Bagaço da Cana para Geração de Energia Elétrica. XI ENGEMA - XI Encontro Nacional e I Encontro Internacional de Gestão Empresarial e Meio Ambiente Fortaleza. **Resumos**, Brasil 2009.

KERBAUY, G. B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Brasília, v. 1, n. 1, p. 30-33, maio 1997.

KNEIFEL, W.; LEONHARDT, W. Testing of different antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 29, p. 139-144, 1992.

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

LEIFERT, C.; WOODWARD, S. Laboratory contamination management: the requirement for microbiological quality assurance. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 52, p. 83-88, 1998.

LEITE, A. D. **A energia do Brasil**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 598 p. 1997.

LEMOS, E.E.P. Micropropagação de Cana-de-Açúcar. In: **Aspectos Práticos na Micropropagação de Plantas**. Cruz das Almas, Cap. 11, p. 257-286. 2009.

LEMOS, E. E. P.; FERREIRA, M. S.; ALENCAR, L. M. C.; RAMALHO NETO, C. E.; ALBUQUERQUE, M. M. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 10, p.1359-1364, out. 2002.

LIU, M. C. Sugarcane. In: SHARP, W. R.; EVANS, D.A.; AMMIRATO, P. V.; YAMANADA, Y. **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan, v. 2, p. 572-602, 1984.

LONG, R. D.; CURTIN, T. F.; CASSELS, A. C. An investigation of the effects of bacterial contaminants on potato nodal cultures. **Acta Horticulturae**, v. 225, p. 83-91, 1988.

MACEDO, A.F. **Metabolismo de poliaminas durante a embriogênese somática de cana-de-açúcar**. 2010. 91p. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, São Paulo.

MACHADO, F. B. P. O açúcar nos 500 anos do Brasil. **STAB**, São Paulo, v. 18, n. 5, p. 4-15, mai/jun. 2000.

MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; Mc KEE, R. A. **Princípios da biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética de plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, Cap. 5, 344 p. 1994.

MARCON, J. **Isolamento e caracterização genética de actinomicetos endofíticos de *Citrus* spp. e interação com *Xylella fastidiosa***. São Paulo, 2002. 91p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo.

MENDES, R. **Diversidade e caracterização genética de comunidades microbianas endofíticas associadas à cana-de-açúcar**. 2008. 119 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2008.

MILANI, L. I. G.; TERRA, N. N.; FRIES, L. L. M.; REZER, A. A. S.; SILVA, L. S.; CAVALHEIRO, C. V. **Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de caqui (*Diospyros kaki*, L.) cv. Quioto**. In: CONGRESO ARGENTINO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - CYTAL®, 7, 2009, Concordia, Argentina. **Anais**. 2009.

MIOCQUE, J. Origem e história da cana caiana. **Álcool & Açúcar**. São Paulo, v. 65, p. 18-24, 1993.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossay with tobacco tissue culture. **Plant Physiology**, Rockville, v. 15, p. 473-497, 1962.

NEWMAN, L.A.; REYNOLDS, C.M. Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants. **Trends in Biotechnology**, v.23, p.6-8, 2005.

NICKELL, L. G. Tissue and cell cultures of sugarcane another research tool. **Hawaii Plant Rec.** v. 57, p. 223-229. 1964.

OLIVARES, F.L.; JAMES, E.K.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist**, Cambridge, Grã-Bretanha, v.135, p.575-597, 1997.

OLIVEIRA, A. R.; GAIO, L. E; JOÃO, I. S.; BONACIM, C. A. G. **Análise da cadeia produtiva da cachaça em Minas Gerais sob a ótica da Economia dos Custos de Transação**. Custos e @gronegócio on line - v. 4, n. 3 - Set/Dez - 2009. Disponível em <www.custoseagronegocioonline.com.br> acesso em 23/01/12.

PEIXOTO NETO, P. A. de S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Micro-organismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 29, p. 62-76, 2002.

PEREIRA, J. E. S.; MATTOS, M. L. T. & FORTES, G. R. L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 7, p. 827-834, 2003.

PILAY, V.J; NOWAK, J. Inoculum density, Temperature, and genotype effects on in vitro growth promotion and epiphytic and entophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedling inoculated with a pseudomonad bacterium. **Canadian Journal of Microbiology**, Otawv.43, p5-6197.

QUADT-HALLMANN, A.; HALLMANN, J.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant-associated bacteria. **Jounal of Microbiology**, Seul, v. 43, p. 254-259. 1997.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHOHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 906 p. 2001.

REED, B. M.; MENTZER, J.; TANPRASERT, P. & YU, X. Internal bacterial contamination of micropropagated hazelnut: identification and antibiotic treatment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 52, p. 67-70, 1998.

REIS JUNIOR, F. B.; SILVA, L. G.; REIS, V. M.; DOBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n. 5, p.985-994, 2000.

REITER, B.; PFEIFER, U.; SCHWAB, H.; SESSITSCH, A. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* sbsp. *Atrospica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.2261-2268, 2002.

RYAN, R.P.; GERMAIN, E. K.; FRANKS, A.; RYAN, D.J.; DOWLING, D.N. Bactérias endofíticas: desenvolvimentos e aplicações recentes. **FEMS Microbiol Lett** 278: 1-9. 2008.

SANTOS, I. B.; LIMA, D. R. M.; BARBOSA, J. G.; OLIVEIRA, J. T. C.; FREIRE, F. J.; SOBRAL, J. K. Bactérias diazotróficas associadas a raízes de cana-de-açúcar: solubilização de fosfato inorgânico e tolerância á salinidade. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, p. 142-149, Mar. 2012.

SAIKKONEN KJ, AHLHOLM M, HELANDER M, LEHTIMAKI S, NIEMELAINEN O. Endophytic fungi in wild and cultivated grasses in Finland. **Ecography**, v. 23, n. 3, p. 360–366, 2000.

SEGPLAN-GO - Secretaria de Estado de Gestão e Planejamento do Estado de Goiás, **Investimentos da indústria e serviços**. Disponível em: <<http://www.segplan.go.gov.br/post/ver/115800/investimentos-da-industria-e-servicos-alcancarao-r-255-bilhoes>>. Acesso em: 25 mar. 2012.

SILVAROLLA, M. B. Plant genomic alterations due to tissue culture. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v. 44, n. 5, p. 329-335, 1992.

SMITH, J. **Micro-propagation of the Gynea Lily: a report for the Rural Industries Research and Development Corporation**. Kingston: RIRDC, 2000, 59 p.

SOUZA, A. S.; COSTA, M. A. P. C.; SANTOS-SEREJO, J. A.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, F. V. D. **Introdução a micropropagação de plantas**. 1. ed. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 152 p.

SOUZA, S. A. **Diversidade de bactérias endofíticas em bananeiras Prata-Anã**. 2011, 101 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Universidade Estadual de Montes Claros-Janaúba, 2011.

STOLTZFUS, J.R.; MALARVITHI, R. S. O; JK LADHA, P. P.; and BRUIJN, F.J.; Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. **Plant Soil** 194:25-36. 1997.

TAYLOR, P. W. J; DUKIC, S. Development of an in vitro culture technique for conservation of *Saccharum* sp. **Plant cell Tissue Organ Cult**. 1993. 34: 217–22.

TRIGIANO, R. N.; NOE, J. P; WINDHAM. T.; WINDHAM, A. **Nematoides parasitas de plantas. In:** Fitopatologia. II Porto Alegre: Artmed, Cap. 8, p. 83-95. 2010.

ZINNIEL, D. K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, N. B.; FENG, Z.; KUCZMARSKI, D.; HIGLE, P.; ISHIMAUR, C. A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R. G.; VIDAVER, A. K.; Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants, **Appl Environ Microbiol** 68(5):2198-2208. 2002.

ZUCCHI, M. I.; ARIZONO, H.; MORAIS, V. A.; FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M C. Genetic instability of sugarcane plants derived from meristem cultures. **Genetics a Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 1, p. 91-96, 2002.

.

3 CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO DE EXPLANTES DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA ESTABELECIMENTO DE CULTURA *IN VITRO*

RESUMO

Na micropropagação, fragmentos de tecidos vegetal chamados explantes são isolados, desinfetados e cultivados assepticamente em meio de cultura. Porém, a oxidação e a contaminação são os principais problemas no início do processo de cultura de tecidos de diversas espécies vegetais. Para que variedades de cana-de-açúcar sejam micropropagadas faz-se necessário, primeiramente, o estabelecimento de protocolos de desinfestação dos explantes, evitando-se a competição de fungos e bactérias pelos nutrientes do meio, a liberação de toxinas e a consequente morte do tecido vegetal. Com o objetivo de iniciar metodologias de estabelecimento *in vitro* de cana-de-açúcar foram realizados tratamentos de descontaminação de ápices caulinares com diferentes tempos de exposição e concentrações de hipoclorito de sódio, casugamicina, etanol e bicloreto de mercúrio. Não houve problemas de oxidação em nenhum dos tratamentos. O uso dos reagentes nas concentrações e tempos testados não mostrou ser fitotóxico. Tratamentos utilizando os maiores tempos de exposição à casugamicina e ao hipoclorito de sódio obtiveram os menores índices de contaminação por fungos e bactérias. Porém, mesmo nestes tratamentos, os índices de contaminação bacteriana foram elevados o que indica a necessidade de uso de novos procedimentos para a obtenção de explantes, como um pré-tratamento das matrizes em casa de vegetação, e o uso de antibióticos no meio de cultura para o controle de bactérias, o principal problema encontrado em todos os tratamentos

Palavras-chave: cultura de tecidos, compostos fenólicos, micro-organismos.

ABSTRACT

CONTAMINATION CONTROL OF SUGARCANE EXPLANTS FOR *IN VITRO* CULTURE ESTABLISHMENT

In micropropagation process, plant tissue explants are isolated, disinfected and aseptically cultured in culture medium. However, oxidation and contamination are the main problems in the initiation of the tissue culture of different plant species. For sugarcane varieties will be micropropagated it is first necessary to establish disinfection protocols for explants, avoiding fungi and bacteria competition for nutrients of the medium, the release of toxins and consequent plant tissue death. In order to initiate methods of *in vitro* sugarcane establishment treatments were performed in decontaminating shoot tips with different exposure times and concentrations of sodium hypochlorite, casugamicina, ethanol and mercuric (II) chloride. No problems of explant oxidation were

detected in treatments. The use of reagent concentrations and times tested was not phytotoxic and treatment using longer times of exposure to casugamicina and sodium hypochlorite obtained the lowest levels of contamination by fungi and bacteria. However, even this treatment, the rates of bacterial contamination were high which indicates the necessity of using new procedures for obtaining explants as a pretreatment of matrices in a greenhouse, and the use of antibiotics in the culture medium for the control of bacteria, the major problem in all treatments.

Keywords: tissue culture, endophytic, microorganisms.

3.1 INTRODUÇÃO

O objetivo principal da micropropagação de cana-de-açúcar é a produção de maneira rápida e em larga escala de mudas de variedades recém-lançadas para suprir os plantios comerciais. A propagação por cultura de tecidos ainda proporciona a grande vantagem de produzir mudas livres de doenças. A micropropagação de cana está cada vez mais sendo usada em biofábricas em inúmeras usinas (Lakshmanan et al., 2005).

Um dos principais problemas encontrados na micropropagação é a contaminação microbiana, seja por fungos e/ou bactérias no início da fase de multiplicação. O problema pode ser intensificado pela natureza endofítica dos contaminantes. Muitas vezes estas contaminações bacterianas surgem no meio após seis ou sete repicagens (Andrade et al., 2002). Estas contaminações impedem o desenvolvimento do explante, não somente pela competição com os nutrientes do meio de cultura, mas, principalmente, pela liberação de compostos tóxicos no meio durante o desenvolvimento de fungos e bactérias (Smith, 2000).

Embora a micropropagação de cana de açúcar tenha sido descrita por muitos autores (Lee, 1987; Cidade et al. 2006), poucos relatam os problemas de contaminantes, principalmente bacterianos, que ocorrem durante a cultura. Pereira (2010) discorre que em geral, admite-se que problemas de contaminação em cultura de tecidos de plantas são causados por técnicas de assepsia insuficientes e não conduzidas corretamente durante as manipulações dos explantes, dos instrumentos ou do próprio técnico que irá manipular o material. Assim, considerou-se necessário investigar formas de obtenção de explantes de cana limpos para estabelecer protocolos de micropropagação das variedades, de cana-de-açúcar do programa de melhoramento genético Ridesa/UFG. Neste contexto, vários agentes esterilizantes e tempos de tratamento foram avaliados.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás – UFG, em Goiânia, GO. Foram utilizados segmentos apicais de 40 cm do colmo (Figura 3.1) de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710 com aproximadamente 6 meses, proveniente do jardim clonal do programa de melhoramento de cana-de-açúcar da UFG/RIDESA localizado na Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da UFG.

3.2.1 Descontaminação

Baseado no trabalho de Melo et al. (2010) foram elaborados seis tratamentos para controlar a oxidação e desinfestação dos explantes. A partir dos colmos da variedade RB98710, foram obtidos os “palmitos” para a retirada do ápice caulinar (Figura 3.1). Estes palmitos foram destinados a tratamentos que utilizaram diferentes concentrações de Kasumin® - fungicida/bactericida sistêmico (KAS), hipoclorito de sódio (NaOCl), etanol (EtOH) e cloreto de mercúrio (HgCl₂). Tempos e concentrações estão indicados na Tabela 3.1.



Figura 3.1 – Etapas para isolamento do ápice caulinar de cana-de-açúcar da variedade RB98710 com 6 meses de idade. 01) Aspecto da planta; 02) região do corte; 03) segmento apical septado; 04) Palmito sem as bainhas foliares e 05) palmito com ápice caulinar.

Tabela 3.1 Tratamentos de desinfestação ápices de cana-de-açúcar para cultivo *in vitro*.

	KAS 2%	Det. 50%	NaOCl 1%	KAS 8%	EtOH 70%	NaOCl 1%	HgCl₂ 0,1%
T1		5 min	20 min	3 h	1 min	20 min	20 min
T2		5 min	10 min	1 h	1 min	10 min	-----
T3	24 h	5 min	20 min	3 h	1 min	20 min	20 min
T4	24h	5 min	10 min	1 h	1 min	10 min	-----
T5	48 h	5 min	20 min	3 h	1 min	20 min	20 min
T6	48 h	5 min	10 min	1 h	1 min	10 min	-----

KAS = Kasumin[®] - fungicida/bactericida sistêmico, **Det.** = detergente neutro diluído em água destilada (1:1), **EtOH** = etanol 70%, **NaOCl** = hipoclorito de sódio com 2,5% de cloro ativo, **HgCl₂** = cloreto de mercúrio.

3.2.2 Inoculação

Os ápices, foram reduzidos a aproximadamente 40 mm x 3 mm (Figura 3.2) e inoculados em tubos de ensaio, contendo 10 ml de meio MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido de 3% de sacarose e 6,5% de ágar. O pH foi ajustado para 5,75 e os tubos foram autoclavados a 123 ± 2 °C, sob pressão de $1,3 \pm 1$ kgf.cm⁻², por vinte minutos. Em cada tubo foi inoculado um explante e vedados com tampa plástica. Após a inoculação os tratamentos permaneceram em câmara de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 1 °C. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos e 30 repetições, o experimento foi avaliado 25 dias após a inoculação e as variáveis observadas foram: *i*) número de explantes oxidados *ii*) número de explantes contaminados com fungos; *iii*) número de explantes contaminados com bactérias. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Figura 3.2. Descontaminação e isolamento do ápice caulinar de cana-de-açúcar. A partir de plantas adultas da variedade RB98710 foram obtidos os primórdios foliares que protegem o ápice caulinar, denominados “palmitos”. **01)** Descontaminação inicial dos palmitos em solução de Kasumin 8% no fluxo laminar. **02)** Utilização de hipoclorito de sódio e etanol 70% para finalizar a descontaminação. **03)** palmito descontaminado e pronto para retirada das bainhas foliares e isolamento do ápice caulinar. **04)** No destaque, ápice caulinar isolado, após a retirada das bainhas. **05)** Retirada da base do palmito imediatamente antes da inoculação do ápice caulinar em meio de cultura. **06)** Ápice caulinar inoculado em meio de cultura MS gelificado solidificado com ágar.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve sinais de fitotoxicidade, e perda de explantes por necrose em nenhum dos tratamentos, indicando que as concentrações dos reagentes e os tempos utilizados não afetaram o tipo de tecido utilizado como explante. Também não ocorreu a oxidação nos explantes em nenhum tratamento. Este resultado se deve, provavelmente, ao uso de Kasumin[®] e ao manuseio adequado dos explantes reduzindo o tempo entre o isolamento dos ápices caulinares e o momento da inoculação em meio de cultura. Silva et al., (2007) também relataram o controle da oxidação em explantes de cana-de-açúcar quando tratados com fungicida Cercobin[®].

A contaminação por fungos e bactérias ocorreu em todos os tratamentos (Tabela 3.2). Porém, o agente contaminante mais importante foram as bactérias, variando de 87,50% a 36,53 %, indicando que a descontaminação dos explantes com os reagentes e

tempos utilizados ainda precisa ser melhorada (Figura 3.3). A contaminação por fungos ocorreu em menor, escala de 0 a 18% (Figura 3.4). Embora a contaminação por fungos possa ter impedido a visualização do crescimento conjunto com bactérias em alguns frascos, este número foi pequeno sem prejuízo da avaliação final.

Tabela 3.2 – Dados de análise de variância, relacionados a contaminação de explante de cana-de-açúcar por fungos e bactérias inoculados em meio MS, após 25 dias de cultivo.

	Fungos	Bacteria	Ambos
T1	2,08 b	87,50 a	87,50 a
T2	18,86 a	77,77 ab	88,67 a
T3	18,00 a	56,00 bc	70,00 a
T4	0,00 b	69,56 ab	69,56 a
T5	5,76 ab	36,53 c	42,30 b
T6	8,20 ab	41,12 bc	49,30 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de *Tukey* no nível de 5%

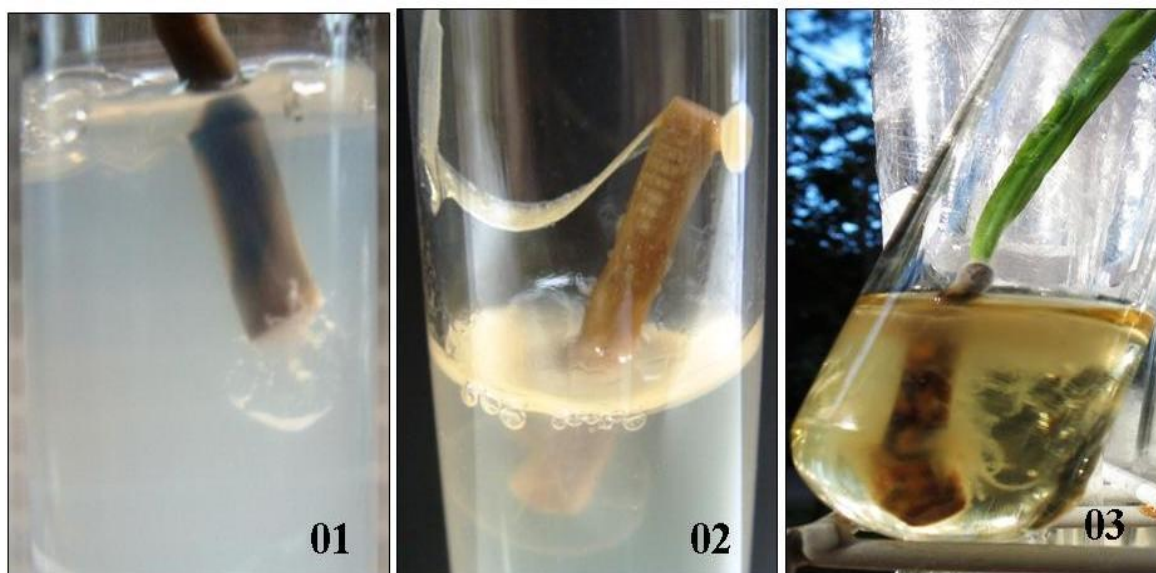


Figura 3.3 – Explantes de cana-de-açúcar da variedade RB98710 evidenciado contaminação por bactérias. 01 e 02 explante em meio sólido 5 dias após a inoculação, 03 meio líquido 20 dias após inoculação.

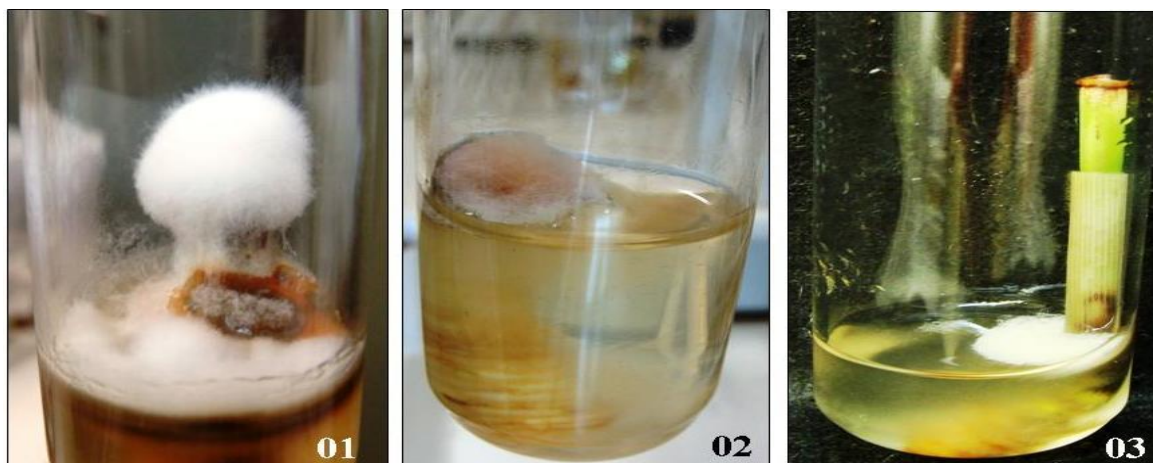


Figura 3.4 – Explantes de cana-de-açúcar da variedade RB98710 evidenciando contaminação por fungos. 01) Explante em meio sólido 5 dias após a inoculação, 02 e 03) explante em meio líquido 5 dias após inoculação.

Nota-se que quanto maior o tempo de exposição inicial ao Kasumin[®] menores foram as taxas de contaminação. O tratamento T5, com maiores tempos de exposição ao Kasumin[®] e hipoclorito de sódio, proporcionou a maior redução nas contaminações por fungos e bactérias. Os resultados também mostram que o uso de cloreto de mercúrio não demonstrou ser eficiente. Deste modo, o uso deste agente descontaminante é desnecessário, pois, além dos cuidados com seu manuseio, o descarte é trabalhoso.

Entretanto, Sato et al. (2001) trabalhando com segmentos nodais de *Celtis* sp para estabelecimento das culturas *in vitro*, constataram que tratamentos utilizando Benomil[®] como fungicida sistêmico apresentou maior contaminação por bactérias em relação ao meio sem Benomil[®]. Segundo os autores, a ação do Benomil[®] diminuindo a população dos fungos, diminuiria também a competição por nutrientes e espaço, permitindo que a população de bactérias aumentasse. Os resultados indicam que o problema da contaminação bacteriana em cana-de-açúcar está relacionado, principalmente, com micro-organismos endofíticos, que por habitarem tecidos mais internos, estão de certa forma protegidos da ação dos agentes assépticos superficiais e não com a competição com fungos presentes na superfície do explante corroborando com Camara et al. (2010).

Uma possibilidade de se reduzir a contaminação por micro-organismos seria a utilização de explantes provenientes de ambientes controlados ao invés de se coletar em campo. Cruz et al. (2009), enfatizam que quanto mais limpa a origem dos explantes, mais fácil será a descontaminação e sugerem o cultivo da planta matriz em condições controladas, como câmara incubadora ou em casa de vegetação. O tratamento da planta

matriz com fungicida, bactericida ou antibiótico por um período antes da extração de explante é outro procedimento que pode ser aplicado para reduzir os índices de contaminação.

3.4 CONCLUSÕES

- O tempo de exposição inicial dos explantes ao Kasumin[®] é fator importante na descontaminação. Quanto maior este tempo inicial menor a contaminação no final do processo, sem causar problemas de fitotoxicidade.
- Todos os tratamentos reduzem o crescimento de fungos. Porém, nenhum tratamento conseguiu controlar a contaminação bacteriana de maneira satisfatória. Novos protocolos de descontaminação utilizando material vegetal obtido de telados com condições ambientes controladas e pré-tratamentos com fungicida sistêmico e a adição de antibióticos no meio de cultura são metodologias que deverão ser testadas no futuro.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, S. R. M. Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento – Documentos / Embrapa Cerrados**. 1. ed. Planaltina-DF, n. 58, p.16, 2002.

CAMARA, T. R.; WILLADINO, L.; ALBUQUERQUE, C. C. Microrganismos assintomáticos do cultivo in vitro: natureza e riscos para o cultivo de plantas. In: SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E (Ed.). **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Embrapa Informação Tecnológica, v. 1, cap. 5, p. 221-260. Brasília 2010.

CRUZ, M. A. L.; SILVA, A. D. C.; VEIGA, C. F. M.; SILVEIRA, V. Biofábricas para produção de mudas por micropropagação: estratégia para o aumento da produtividade de cana-de-açúcar no Rio de Janeiro. **Revista Científica Internacional**, ano 2, nº 05, 2009. 18 p. Disponível em: <<http://www.interscienceplace.org/interscienceplace/article/download/50/55>>. Acesso em: 15 fev. 2012.

LAKSHMANAN, P. Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 41, p. 345-363, Jul/Aug. 2005.

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

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

MELO, E. F.; MELO C. G.; RODRIGUES, C. R.; VIEIRA, M. S.; RAMOS, R. S.; LOUREIRO, M. E.; BARBOSA, M. H. P. Otimization of disinfection and establishment of in vitro explants of sugarcane (*Saccharum* spp.) in: 2nd Pan American congress on Plants and BioEnergy, São Pedro. **Resumos**, 2010. p. 50-51.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossay with tabacco tissue culture. **Plant Phisiology**, Rockville, v. 15, p. 473-497, 1962.

SATO, A. Y.; DIAS, H. C. T.; ANDRADE, L. A.; Micropropagação de *Celtis* sp.: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, Lavras, v.7, n. 2, p. 117-123, 2001.

SILVA, R. M. S.; SOUZA, C. D.; LEMOS, E. E. P.; REZENDE, L. P. Controle de contaminantes fúngicos na micropropagação de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Magistra**, Bahia, v. 19, n. 3, p. 191-197, jul/set. 2007.

SMITH, J. **Micro-propagation of the Gynea Lily: a report for the Rural Industries Research and Development Corporation**. Kingston: RIRDC, 2000, 59 p.

4 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS À CANA-DE-AÇÚCAR

RESUMO

A contaminação microbiana é um grande problema em cultura de tecidos vegetais. Frascos com fungos e/ou bactérias são classificados como contaminados e descartados. Entretanto, estes contaminantes não obrigatoriamente causam doenças nem provocam a morte dos explantes. Há casos onde o cultivo associado pode se tornar uma opção, pois os micro-organismos contaminantes podem produzir diferentes fatores responsáveis pela adaptação do vegetal a condições ambientais adversas. Atualmente, sabe-se que a cana-de-açúcar está associada diferentes bactérias endofíticas com capacidade de fixação de nitrogênio. Entre essas bactérias algumas são de caráter endofítico obrigatório. Estudo da interação de bactérias endofíticas em cana-de-açúcar já é bastante desenvolvido para variedades utilizadas na região Sudeste do Brasil, mas ainda são poucos os estudos para as variedades das regiões Nordeste e principalmente, da Região Centro-Oeste. Com o objetivo de melhor estudar os micro-organismos endofíticos, e sua relação com a planta hospedeira, promoveu-se o isolamento de bactérias contaminantes de explantes de cinco diferentes variedades de cana-de-açúcar preconizadas para Goiás, visando a determinação de algumas características morfológicas e fisiológicas como: produção de ácido indol acético, solubilização de fosfato e a sensibilidade a antibióticos. Os isolados obtidos possuem diversidade para características morfo-tintoriais e bioquímicas sendo caracterizados como bastonetes gram-positivos. Todos os isolados apresentaram capacidade de produção de fatores de crescimento vegetal como AIA e solubilização do fosfato. Após teste de sensibilidade a antimicrobianos, os antibióticos Ciprofloxacino e Ceftazidima foram os que apresentaram maior potencial de controle do crescimento dos isolados.

Palavras-chave: diversidade bacteriana, caracterização fisiológica, antibióticos.

ABSTRACT

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ENDOPHYTIC BACTERIA ASSOCIATED WITH SUGARCANE

Microbial contamination is a major problem in plant tissue culture. Bottles with yeast and / or bacteria are classified as contaminated and discarded. However, these contaminants do not cause disease mandatorily or even the explants death. There are cases where the associated microbial culture can become an option, because the contaminating microorganisms may produce different factors responsible for plant adaptation to adverse

environmental conditions. Currently, it is known that sugarcane is associated with different endophytic bacteria able to fix nitrogen. Studies of the interaction of endophytic bacteria in sugarcane is already well developed for varieties used in the Southeast region of Brazil, but there are few studies of the varieties used in the Northeast and especially in the the Midwest Region. In order to better study the endophytic micro-organisms and their relationship with the host plant, promoted the isolation of bacteria in explants of five different varieties of sugarcane recommended for the satate of Goiás/Brazil, in order to determine some morphological and physiological characteristics as indole acetic acid production, phosphate solubilization and sensitivity to antibiotics. The isolates have diversity for morphological and biochemical staining and are characterized as gram-positive bacillus. All isolates were capable of producing growth plant factors such as IAA and phosphate solubilization. After antimicrobial susceptibility testing, antibiotics Ciprofloxacin and Ceftazidime presented the greatest potential for controlling the growth of the isolates.

Keywords: Bacterial diversity, physiological characterization, antibiotics.

4.1 INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar vem ocupando um lugar de destaque na economia brasileira, desde a sua implantação na fase de colonização até os dias de hoje. Ocupa uma área plantada de 8.567,2 mil hectares, o que significa na safra de 2012 o processamento de cerca 602,2 milhões de toneladas de cana-de-açúcar (Conab, 2012). Este papel tende a aumentar devido a crescente demanda de etanol para uso como biocombustível.

Tradicionalmente, os trabalhos de pesquisa com cana-de-açúcar visam o seu melhoramento, seja por metodologias clássicas ou atualmente com a utilização de técnicas de biologia molecular e também melhorias no manejo cultural. A cultura de tecido vegetal é uma entre as diversas metodologias moleculares utilizadas e seu emprego visa a multiplicação de material genético, troca e avaliação de germoplasma, produção de mudas livres de vírus. Sua aplicação também se estende ao aumento da variabilidade genética, mediante a produção de variantes somaclonais e produção de calos, fase essencial para a obtenção de plantas transgênicas (Andrade et al., 2002).

Rotineiramente, ocorre a contaminação microbiana em cultura de tecidos. Este fato, em muitos casos, é devido a uma baixa eficiência do processo de limpeza clonal a partir da cultura de meristemas o que não garante totalmente a sanidade do material trabalhado (Liu, 1989; Torres et al., 1998). Sendo conhecida como um dos mais sérios problemas da cultura de tecidos de plantas, especialmente, em espécies tropicais (Kneifel & Leonhardt, 1992).

Esta contaminação afeta os laboratórios de pesquisa e comerciais de micropropagação, uma vez que nestes casos, os frascos são geralmente descartados. Entretanto, estes contaminantes na maioria das vezes não provocam a morte dos materiais estabelecidos *in vitro*, diretamente, por causarem doenças nas plantas ou mesmo há casos onde o cultivo associado pode se tornar uma boa opção, pois os micro-organismos contaminantes podem produzir diferentes fatores responsáveis pela adaptação do vegetal a condições ambientais adversas (Costa et al., 2010; Grattapaglia & Machado, 1998).

Os vegetais normalmente coexistem com os micro-organismos, sendo considerados microecossistemas complexos, onde diferentes nichos ecológicos podem ser explorados seja por bactérias epifíticas, seja por bactérias endofíticas (Costa et al., 2010, Sturz et al., 2000). Rosenbluent & Martinez-Romero (2006) sugerem que as interações entre vegetais e micro-organismos são responsáveis por um melhor desempenho e desenvolvimento vegetal e consequentemente rendimento de colheita.

Bactérias endofíticas são aquelas que possuem uma parte do seu ciclo de vida no interior dos vegetais, não causando, aparentemente, doenças nos mesmos (Azevedo, 1998). Estes micro-organismos vem despertando grande interesse, seja pela produção de substâncias farmacologicamente ativas e com potencial biotecnológico (taxol, *Pestalotiopsis microspora*), agentes antifúngicos (quercina, *Cryptosporiopsis criptocandina*), além da produção de fatores de crescimento vegetal, toxinas, enzimas, podendo ser utilizados também no controle biológico de doenças e pragas (Araújo et al., 2002; Azevedo 1998; Stierle et al., 1993; Strobel, 2002).

Bactérias promotoras do crescimento vegetal são caracterizadas por promoverem efeitos positivos para a planta. Estes efeitos podem ocorrer por influência direta ou indireta. A influência direta ocorre pelo aumento da solubilização e entrada de nutriente ou pela produção de reguladores de crescimento vegetal. A influência indireta ocorre pela supressão de patógenos, produção de sideróforos ou antibióticos (Asghar et al., 2002).

Atualmente, sabe-se que a cana-de-açúcar está associada a diferentes bactérias endofíticas com capacidade de fixação de nitrogênio. Entre essas bactérias podemos destacar *Acetobacter diazotrophicus* (Gillis et al., 1989) e *Herbaspirillum* spp. pelo seu caráter endofítico obrigatório (Baldani et al., 1996; Baldani et al., 1997; Gillis et al., 1991). Além disso, Rosenbluent & Martinez-Romero (2006) sugerem que estas interações sejam uma alternativa para o melhoramento do desenvolvimento vegetal.

O estudo da interação de bactérias endofíticas em cana-de-açúcar já é bastante desenvolvido para variedades utilizadas na região Sudeste do Brasil (Baldani et al., 2002). Porém, poucos são os trabalhos sobre bactérias endofíticas em cana-de-açúcar para variedades das regiões Nordeste e, principalmente, da Região Centro-Oeste.

Este trabalho teve como objetivos o isolamento, caracterização e controle de bactérias endofíticas de explantes de cinco diferentes variedades de cana-de-açúcar do programa de melhoramento da UFG.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Isolamento das bactérias

Explantes das variedades RB98710, RB034068, RB034130, RB034120 e RB034041 que apresentaram contaminação bacteriana após 96 horas de crescimento *in vitro* foram encaminhados ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para o isolamento e caracterização dos contaminantes.

Os contaminantes bacterianos isolados foram inoculados em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) contendo sacarose 20 g.L⁻¹, mio-inositol 0,1 g.L⁻¹, tiamina 0,1 g.L⁻¹, KIN (citocinina) 0,1 mg.L⁻¹, BAP (citocinina) 0,2 mg.L⁻¹, ácido cítrico 150 mg.L⁻¹, ágar 18 g.L⁻¹, NH₄NO₃ 1,65 g.L⁻¹, KNO₃ 1,9 g.L⁻¹, CaCl₂.2H₂O 0,44 g.L⁻¹, MgSO₄.7H₂O 0,37 g.L⁻¹, KH₂PO₄ 0,17 g.L⁻¹, MnSO₄.H₂O 16,9 mg.L⁻¹, H₃BO₃ 6,2 mg.L⁻¹, ZnSO₄.7H₂O 0,83 mg.L⁻¹, KI 0,83 mg.L⁻¹, Na₂MoO₄.2H₂O 0,25 mg.L⁻¹, CuSO₄.5H₂O 0,025 mg.L⁻¹; CoCl₂.6H₂O 0,025 mg.L⁻¹, Solução de FeEDTA: Na₂EdTA.2H₂O 37,3 mg.L⁻¹, FeSO₄.7H₂O 27,8 mg.L⁻¹, ácido nicotínico 0,005 mg.L⁻¹, piridoxina 0,005 mg.L⁻¹, glicina 2 mg.L⁻¹, o pH foi ajustado para 5,75 e incubados em estufa a 30°C até o desenvolvimento de colônias bacterianas características. As colônias crescidas isoladamente foram novamente inoculadas no mesmo meio de cultura e reincubadas por 24-48 h nas mesmas condições descritas anteriormente. Este procedimento foi repetido cinco vezes para a obtenção de culturas puras. As bactérias isoladas foram nomeadas segundo a origem do explante e preservadas em glicerol (15%) a -20°C.

4.2.2 Determinação de características fisiológicas e bioquímicas dos isolados

4.2.2.1 Caracterização morfo-tintorial

Uma pré-caracterização para as bactérias foi realizada utilizando a reação de Ryu (Ryu, 1938, 1940). A reação de Ryu consiste no tratamento de uma suspensão bacteriana, crescida por 12-24 h, com uma solução de KOH a 3 mol.L^{-1} . As células gram-negativas sofrem uma lise aumentando a viscosidade do meio, enquanto para as gram-positivas este fato não ocorre. A confirmação e a caracterização morfológica final foram realizadas pela coloração de Gram tradicional.

4.2.2.2 Determinação de características de atividade enzimática pelos isolados endofíticos

Determinação de seis tipos de atividade enzimática: amilolítica, celulolítica, esterásica e lipolítica, pectinolítica e proteolítica. Estas enzimas são importantes para a determinação das características bioquímicas e fisiológicas das bactérias com uma possível atividade de promoção do crescimento vegetal.

Bactérias cresceram em tubos contendo 5,0 mL de caldo BHI e foram incubadas em estufa a 30°C por 24-48 h. Após este tempo, 50 µL do caldo foi inoculado com o auxílio de um inoculador de Stryer (Figura 4.1). As atividades foram determinadas inoculando sobre meios específicos, seguindo ensaios específicos (Hankin et al., 1971; Hankin & Anagnostakis 1975; Samantha et al., 1989; Sierra, 1957; Renwick et al., 1991; Vieira, 1999).

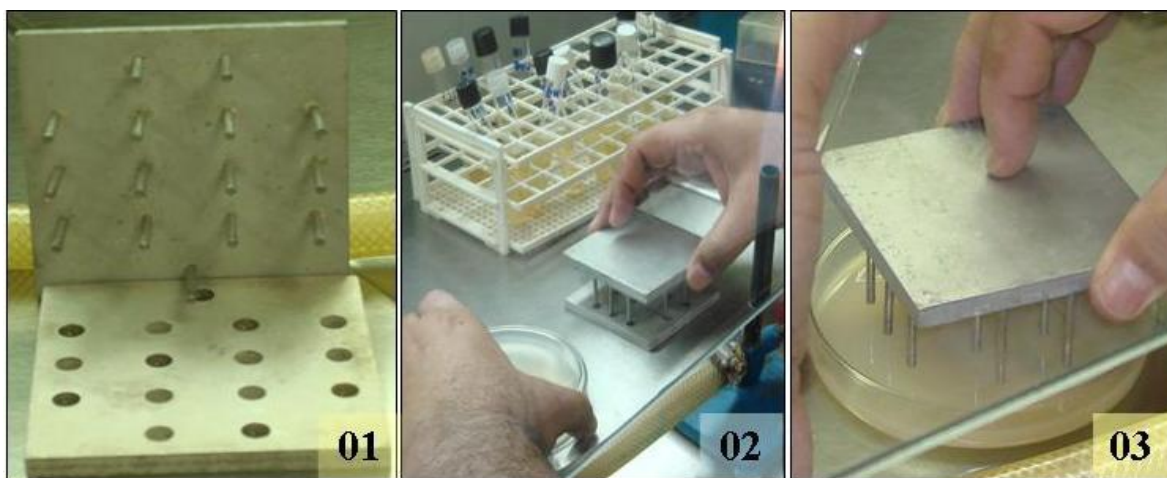


Figura 4.1 Inoculador de Stryer. 01) Inoculador de Stryer em vista frontal, 02) coleta de material dos diferentes isolados, 03) inoculação em placa de petri.

Determinação da atividade amilolítica. Para a determinação da atividade amilolítica foi utilizada a metodologia descrita por Hankin & Anagnostakis (1975). Os isolados foram crescidos como no item 4.2.2.2 e inoculados em placas de Petri contendo ágar nutriente, suplementado com 0,2% de amido solúvel e o pH ajustado para 6,0. Após a incubação a 30°C por oito dias, as placas foram tratadas com vapor de iodo até a visualização de halos claros ao redor das colônias, indicando positividade.

Determinação da atividade celulolítica. Para determinação da atividade celulolítica dos isolados que foram crescidos como no item 4.2.2.2 e inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura TSA (Trypticase Soy Agar) suplementado com 10 g de celulose em pó.L⁻¹. As placas foram então incubadas a 30°C por oito dias. A positividade para a produção da enzima foi determinada pelo desenvolvimento de um halo claro ao redor das colônias uma vez que a celulose produz uma turbidez no meio de cultivo (Samantha et al., 1989).

Determinação da atividade esterásica ou lipásica. Para determinação da atividade esterásica e lipolítica os isolados foram crescidos como no item 4.2.2.2 e inoculados em placas de Petri contendo o meio de cultura constituído de (g.L⁻¹): 10,0 bactopectona; 5,0 NaCl; 0,1 CaCl₂H₂O e 18,0 ágar, pH 7.4 suplementado com 1% de Tween 20 (atividade esterásica) ou de Tween 80 (atividade lipásica). As placas foram então incubadas a 30°C por oito dias. A positividade para a produção das enzimas foi determinada pelo desenvolvimento de um halo claro ao redor das colônias (Sierra, 1957).

Determinação da atividade pectinolítica. Para determinação da atividade pectinolítica dos isolados que foram crescidos como no item 4.2.2.2 e inoculados em placas de Petri contendo o meio de cultivo constituído de (g.L⁻¹): Solução A: 4,0 KH₂PO₄; 6,0 Na₂HPO₄; 200,0 mL de H₂O. Solução B: 5,0 pectina; 200 mL de H₂O e Solução C: 2,0 (NH₄)₂SO₄; 0,01 FeSO₄ 7.H₂O; 0,2 MgSO₄ . 7H₂O; 0,001 CaCl₂; 1,0 extrato de levedura; 15,0 Ágar 600 mL de H₂O; pH 7,4. As soluções foram autoclavadas separadamente, em seguida, misturadas e vertidas em placas de Petri. Os isolados foram inoculados nas placas e posteriormente incubados a 30°C por oito dias. A positividade para a produção da enzima foi determinada pelo desenvolvimento de um halo claro ao redor das colônias após serem incubadas por uma hora a temperatura ambiente, com uma solução de brometo de hexadeciltrimetil amônio (CTAB) a 1% (v/v) e posterior lavagem com água destilada esterilizada (Hankin et al., 1971).

Determinação da atividade proteolítica. Para determinação da atividade proteolítica, os isolados foram crescidos como no item 4.2.2.2 e inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura Agar Nutriente suplementado com leite comercial desnatado 1% (v/v). As placas foram incubadas a 30°C por oito dias. A positividade para a produção da enzima foi determinada pelo desenvolvimento de um halo claro ao redor das colônias após exposição das placas de Petri a uma solução de ácido acético a 5% (Vieira, 1999).

4.2.3 Produção de fatores de crescimento vegetal

Foi determinada a capacidade de solubilização de fosfato e de produção de ácido indol acético (AIA) como fatores de crescimento pelos isolados.

4.2.3.1 Teste para solubilização de fosfato

Para determinação da solubilização de fosfato pelos isolados promoveu-se o crescimento como no item 4.2.2.2 e inoculados em placas de Petri contendo o meio de cultivo constituído de TSA (*Trypticase Soy Agar*) com 1/10 da força, pH 7.0, onde se formou um precipitado de CaHPO_4 . O precipitado de CaHPO_4 é resultante da reação de 50 mL da solução de K_2HPO_4 0,57 M e de 100 mL de uma solução de CaCl_2 0,9 M adicionados a 850 mL de TSA a 1/10. As placas foram incubadas a 30°C por oito dias. A positividade para a solubilização do fosfato foi determinada pelo desenvolvimento de um halo claro ao redor das colônias (Katznelson & Bose, 1959).

4.2.3.2 Teste para produção de ácido indol-acético (AIA)

Para determinação de ácido indol-acético os isolados foram crescidos como no item 4.2.2.2. Após o crescimento, 10 μL dos crescimentos foram inoculados em tubos de cultivo contendo 5,0 mL do meio de cultivo TSB (Caldo tripticaseína de soja) com 1/10 da força suplementado e não suplementado com 5 mM de L-triptofano. Os tubos foram incubados na ausência de luz, sob agitação a 130 rpm, 30°C por 24 horas. Após este tempo, 500 μL do reagente de Salkowski (1,0 mL da solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,5 mol/L em 50,0 mL de HClO_4 34%) foram adicionados aos tubos e em sequencia incubados por 30 min. a

30°C na ausência de luz. O resultado positivo foi caracterizado pela formação de uma coloração rósea nos tubos suplementados com L-triptofano (Bric et al., 1991).

4.2.4 Teste de sensibilidade a antimicrobianos

Para a determinação da sensibilidade dos isolados frente a diferentes antimicrobianos foi utilizado a metodologia de difusão em ágar de Kirby & Bauer (Bauer et al., 1966). Os isolados foram crescidos em meio TSA a 30°C por 24 h. Após este período, os isolados tiveram sua concentração ajustado para metade da turbidez do tubo N°1 da escala de McFarland e então inoculado com o auxílio de “swab” sobre placas de Petri contendo meio ágar Müller-Hinton. Sobre estas placas inoculadas, foram dispostos discos contendo seguintes antibióticos: Norfloxacino (10 µg), Penicilina G (10 UI), Cefoxitina (30 µg), Teicoplanina (30 µg), Eritromicina (15 µg), Ácido Nalidíxico (30 µg), Ampicilina (10 µg), Clindamicina (2 µg), Tobramicina (10 µg), Ampicilina/Sulbactam (10/10 µg), Ciprofloxacino (5 µg), Aztreonam (30 µg), Ceftriaxona (30 µg), Vancomicina (30 µg), Cefepima (30 µg), Claritromicina (15 µg) e Ceftazidima (30 µg). As placas foram incubadas a 30°C por 24 h. O desenvolvimento de zonas de inibição de crescimento ao redor dos discos foram medidas e comparadas com uma tabela de sensibilidade padrão. Os resultados foram expressos como micro-organismo sensível ou resistente.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Isolamento e identificação preliminar

Colônias foram visíveis no meio de cultura para crescimento vegetal três a sete dias após a inoculação do explante. A utilização deste meio visou reduzir a perda de bactérias endofíticas quando isoladas. Esta perda pode ser caracterizada pelo não crescimento bacteriano em inoculações posteriores (Carrim et al., 2006; Polesi, 2010). O tempo de incubação foi suficiente para o crescimento bacteriano uma vez que alguns isolados possuíam um crescimento lento. Fenômeno semelhante também foi observado por Reed et al. (1998). As colônias possuíam uma coloração que variou de branco a amarelado.

A afinidade tintorial aos corantes de Gram das bactérias isoladas dos explantes de cana-de-açúcar pode ser observada na Tabela 4.1 e Figura 4.2. Na Tabela 4.1 observa-se o padrão de morfologia, coloração de Gram e reação de Ryu para os isolados. Pode-se observar que os isolados possuem a morfologia de bacilos e apresentam como gram-positivos.

Tabela 4.1 Características morfológicas, tintoriais e identificação dos isolados bacterianos de cultura de tecido de cinco variedades de cana-de-açúcar.

ISOLADOS	Explante de Origem	Reação de Ryu	Morfologia	Coloração de Gram
02	RB-034130	+	Bastonete	+
04	RB-034068	+	Bastonete	+
05	RB-034120	+	Bastonete	+
06	RB-034041	+	Bastonete	+
07	RB-034041	+	Bastonete	+
08A	RB-98710	+	Bastonete	+
08B	RB-98710	+	Bastonete	+
09	RB-98710	+	Bastonete	+
11A	RB-98710	+	Bastonete	+
11B	RB-98710	+	Bastonete	+
12A	RB-98710	+	Bastonete	+
12B	RB-98710	+	Bastonete	+
13	RB-98710	+	Bastonete	+

Os resultados para atividade de diferentes enzimas podem ser visualizados na Tabela 4.2. Estes resultados, preliminares para a identificação dos isolados e a análise da Tabela 4.1 e Figura 4.2 permitem agrupar os isolados nos seguintes grupos: isolados 02, 05, 06, 08A, 12A e 12B como únicos. Os isolados 7 com 8B, 4 com 13 e os isolados 9, 11A, e 11B. Indicando uma diversidade de isolados com a presença de pelo menos oito espécies bacterianas.

Trabalhos de isolamento de bactérias endofíticas de cana-de-açúcar têm sido realizados em diferentes laboratórios no Brasil (Goldstein, 1986; Oliveira et al., 2002; Baldani & Baldani, 2005; Mendes, 2008). Nestes trabalhos foram observadas bactérias principalmente dos gêneros *Azospirillum*, *Gluconoacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Pseudonomas*, *Rhizobium*, *Erwinia*, *Agrobacterium* e alguns *Bacillus*. Com exceção dos *Bacillus* gram-positivos, todas as demais bactérias são gram-negativas. Neste

trabalho observamos uma predominância de bactérias gram-positivas. Sugerindo que estes isolados sejam de novos gêneros e/ou espécies.

Tabela 4.2 Atividades enzimáticas dos isolados bacterianos de cultura de tecido de cinco variedades de cana-de-açúcar

ISOLA- DOS	ATIVIDADES ENZIMÁTICAS ¹					
	PROTEASE	CELULASE	AMILASE	PECTINASE	TWEEN 20	TWEEN 80
02	-	-	+	-	+	-
04	+	-	-	-	+	+
05	+	-	+	-	+	+
06	-	-	+	-	+	-
07	+	-	-	-	+	+
08A	+	-	-	-	+	+
08B	+	-	+	-	-	-
09	+	-	+	-	+	+
11A	-	-	+	-	+	+
11B	+	-	+	-	-	-
12A	-	-	-	-	+	+
12B	+	-	+	-	-	-
13	+	-	-	-	+	+

¹ Média de 3 repetições.

4.3.2 Produção de fatores de crescimento vegetal

Os resultados para a produção de ácido indolacético (AIA) indicam que todos os isolados testados demonstraram capacidade de produção de AIA, conforme ilustrado na Figura 4.3 e registrado na Tabela 4.3. A produção de AIA em bactérias ocorre por varias vias de síntese metabólica, porém, a adição de L-Triptofano ao meio de cultivo promove o aumento desta síntese (Kuss et al., 2007). Zakharova et al. (1999) e Halda-Alija (2003) observaram em seus experimentos que alguns espécimes bacterianos diazotróficos eram capazes de produzir AIA na ausência de L-Triptofano. Kuss et al. (2007) observaram que 90% dos isolados de *Azospirillum* por eles testados produziam AIA por uma rota diferente da de L-Triptofano. Este fato não ocorreu com os isolados aqui analisados. Na Figura 4.3 podemos observar que a produção de AIA ocorreu somente no meio de cultivo contendo L-Triptofano, sugerindo uma dependência deste.

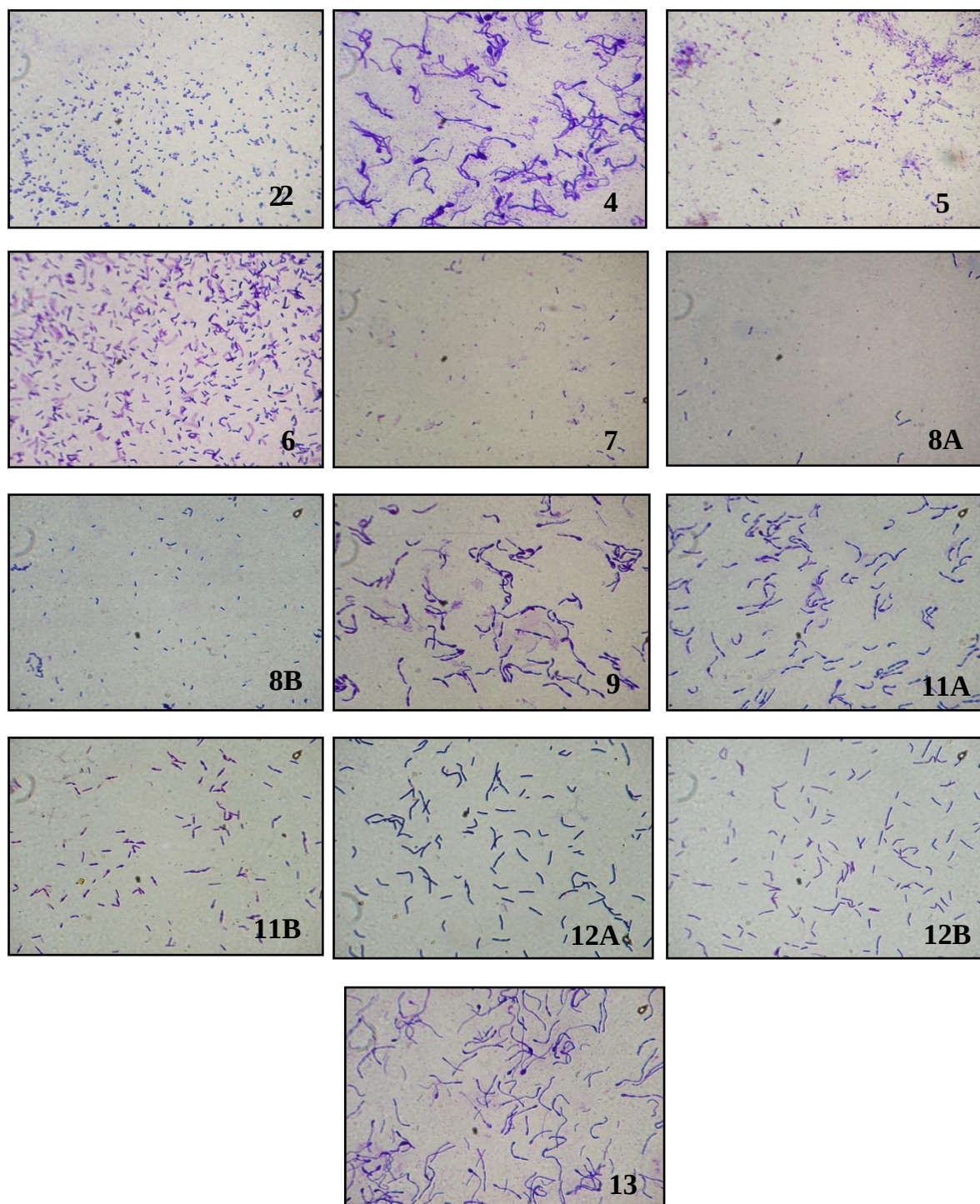


Figura 4.2 Microfotografia evidenciando a afinidade tintorial aos corantes de Gram de treze isolados de explantes de cinco variedades de cana-de-açúcar. Aumento de 1.000X.

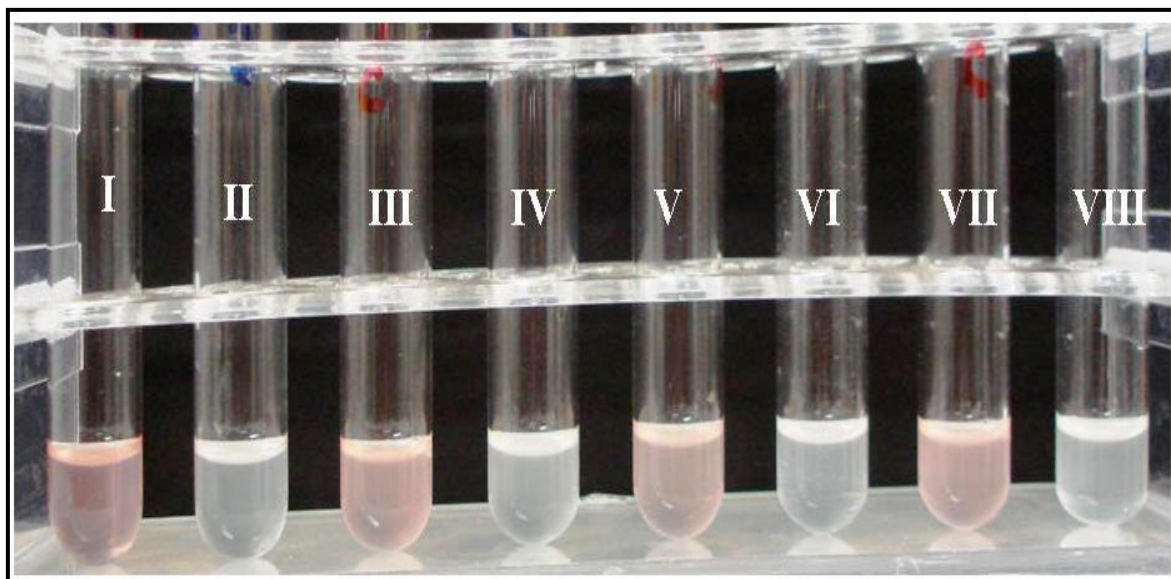


Figura 4.3 Determinação da produção de AIA por isolados de bactérias endofíticas de cana-de-açúcar em meio de cultura com e sem L-Triptofano. **I** - Isolado 08A com L-Triptofano, **II** - Isolado 08A sem L-Triptofano, **III** - Isolado 05 com L-Triptofano, **IV** - Isolado 05 sem L-Triptofano, **V** - Isolado 06 com L-Triptofano, **VI** - Isolado 06 sem L-Triptofano, **VII** - Isolado 07 com L-Triptofano, **VIII** - Isolado 07 sem L-Triptofano. A coloração rósea nos tubos indica capacidade produtora de AIA.

A produção de auxinas é um mecanismo de promoção de crescimento de vegetais, sendo as auxinas hormônios capazes de regular o crescimento, aumentando o desenvolvimento radicular e melhorando a absorção de nutrientes. A auxina é um fitormônio produzido nas plantas, mas também é produzido por algumas espécies bacterianas conforme relata Dobbelaere et al., (2003).

O teste utilizado para a determinação da solubilização de fosfato inorgânico pelas bactérias mostrou-se adequado, pois permitiu a visualização de um halo translúcido ao redor das colônias positivas (Figura 4.4). Observou-se que todos os isolados testados possuem a capacidade de solubilizar fosfato (Tabela 4.3).

Diferentes autores já identificaram e descreveram bactérias endofíticas com capacidade de solubilização de fosfato para diferentes vegetais (Verna et al., 2001; Kuklinsky-Sobral et al., 2004).

O fosfato é considerado um nutriente limitador ao crescimento vegetal, a sua disponibilidade permite o desenvolvimento do sistema radicular e aéreo dos vegetais, evitando a atrofia dos caules e folhas. Mesmo estando presente nos solos, pode apresentar deficiência na sua forma disponível para os vegetais (Grant et al., 2001; Gyaneswar et al., 2002).

Tabela 4.3 Atividade de Produção de fatores de crescimento dos isolados bacterianos de cultura de tecido de cana-de-açúcar

Isolados	Produção de Fatores de Crescimento ¹	
	AIA ²	Solubilização de Fosfato
2	+	+
4	+	+
5	+	+
6	+	+
7	+	+
8A	+	+
8B	+	+
9	+	+
11A	+	+
11B	+	+
12A	+	+
12B	+	+
13	+	+

¹. Média de tres repetições. ² Ácido Indol-acético

Micro-organismos como *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Bacillus*, etc tem sido estudados como uma medida visando aumentar a solubilização de fosfato de rochas ou das formas não disponíveis aos vegetais (Goldstein 1986; Gyaneswar et al., 2002; Luvizotto, 2008).

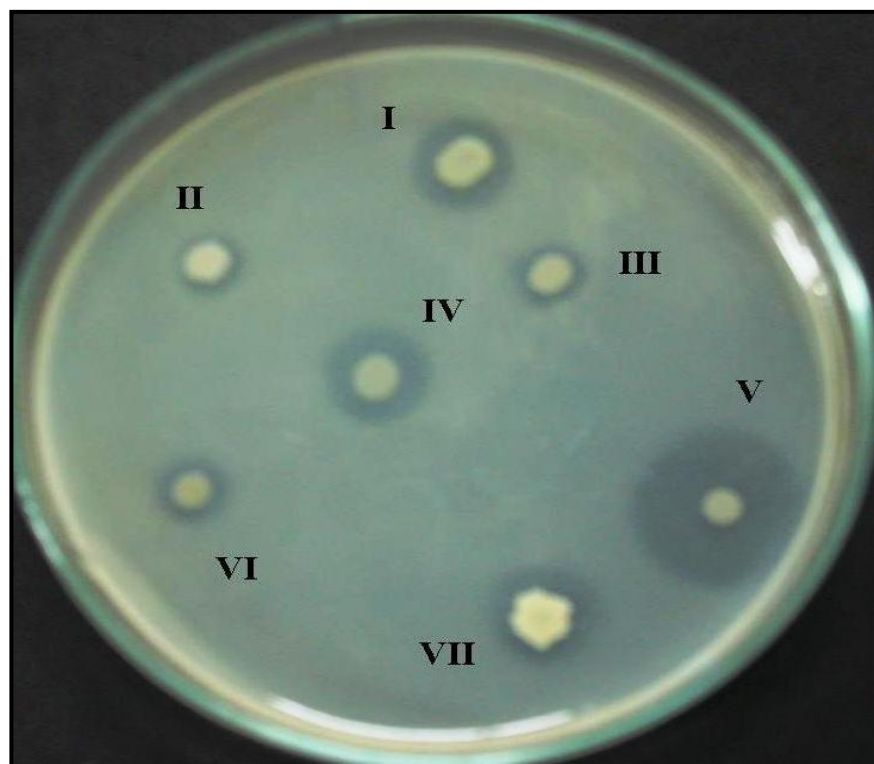


Figura 4.4 Resultado de teste de solubilização de fosfato em bactérias endofíticas de cana-de-açúcar. **I**- Isolado 02, **II**- Isolado 04, **III**- Isolado 05, **IV**- Isolado 06, **V**- Isolado 07, **VI**- Isolado 8A, **VII**- Isolado 8B. Os halos claros ao redor das colônias indicam capacidade de solubilização.

A solubilização se dá pela produção de ácidos orgânicos e inorgânicos e/ou diminuição do pH. Este fato aumenta a perspectiva da utilização de fertilizantes que possuem baixa concentração de fosfato solúvel (Vassilev & Vassileva, 2003). A solubilização pode se dar pelo uso de inoculantes de micro-organismos solubilizadores ou mesmo seu manejo (Goldstein, 1986; Gyaneswar et al., 2002; Luvizotto, 2008).

4.3.3 Teste de sensibilidade a antimicrobianos

Dos dezessete antibióticos testados somente Ciprofloxacino e Ceftazidima foram ativos frente a todos os isolados bacterianos (Tabela 4.4). Este é o primeiro trabalho a relatar o emprego destes dois antibióticos frente a bactérias endofíticas de cana-de-açúcar (Figura 4.5).

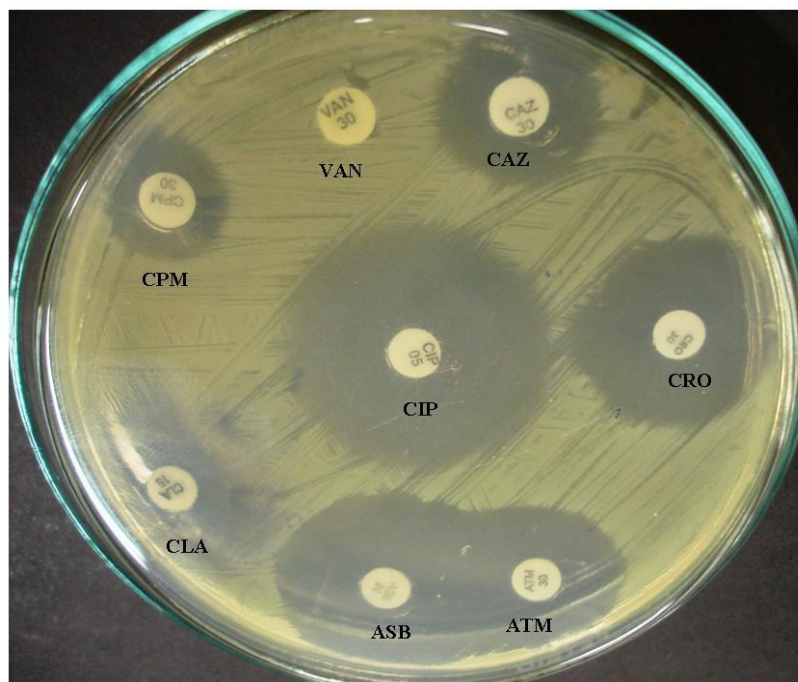


Figura 4.5 Teste para determinação da sensibilidade de isolados endofíticos de cana-de-açúcar, após 24h de incubação a 30°C. O diâmetro da zona de inibição de crescimento ao redor dos discos é indicativo de sensibilidade. **ASB** - Ampicilina/Sulbactam (10/10µg); **CIP** - Ciprofloxacino (5µg); **ATM** - Aztreonam (30µg); **COR** - Ceftriaxona (30µg); **VAN** - Vancomicina (30µg); **CLA** - Claritromicina (15µg); **CAZ** - Ceftazidima (30µg) e **CPM** - Cefepima (30µg).

Os dois antibióticos que demonstraram atividade *in vitro* são um primeiro caminho na determinação de um controle inicial para os contaminantes de cana-de-açúcar em variedades preconizadas para a região de Cerrado goiano, porém Sherwinski-Pereira & Costa (2010) alertam que a descontaminação pode não ser total uma vez que o tecido vegetal pode interferir nos resultados.

Reed et al. (1988) testando diferentes antibióticos em bactérias contaminantes de cultivo celular de avelã, observaram que um único antibiótico não foi eficiente para a eliminação intravegetal dos contaminantes. A combinação de Estreptomicina com Timentin ou Gentamicina foi eficiente.

Tabela 4.4 Antibiograma dos isolados bacterianos de cultura de tecido de cana-de-açúcar

ISOLA- DOS	ANTIBIÓTICOS																
	NOR	PEN	CFO	TEC	ERI	NAL	AMP	CLI	TOB	ASB	CIP	ATM	COR	VAN	CPM	CLA	CAZ
02	S	R	S	R	R	S	S	R	S	R	S	S	S	R	S	R	S
04	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S
05	S	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S
06	S	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S
07	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S
08A	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	S
08B	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
09	S	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S
11A	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S
11B	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
12A	S	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S
12B	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
13	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S

R – Resistente; S – Sensível; **NOR** - Norfloxacino (10µg); **PEN** - Penicilina G (10UI); **CFO** - Cefoxitina (30µg); **TEC** - Teicoplanina (30µg); **ERI** - Eritromicina (15µg); **NAL** - Ác. Nalidíxico (30µg); **AMP** - Ampicilina (10µg); **CLI** - Clindamicina (2µg); **TOB** - Tobramicina (10µg); **ASB** - Ampicilina/Sulbactam (10/10µg); **CIP** - Ciprofloxacino (5µg); **ATM** - Aztreonam (30µg); **COR** - Ceftriaxona (30µg); **VAN** - Vancomicina (30µg); **CPM** - Cefepima (30µg); **CLA** - Claritromicina (15µg); **CAZ** - Ceftazidima (30µg).

4.4 CONCLUSÕES

- Os isolados obtidos dos diferentes explantes possuem diversidade quanto as características morfo-tintoriais como bioquímicas (produção de enzimas) sendo todos caracterizados como bastonetes gram-positivos;
- Todos os isolados apresentam capacidade de produção de fatores de crescimento vegetal (AIA e solubilização do fosfato);
- Os antibióticos Ciprofloxacino e Ceftazidima apresentam potencial para a utilização no controle do crescimento de bactérias na fase inicial de cultura de tecido em cana-de-açúcar.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, S. R. M. Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento – Documentos / Embrapa Cerrados**. 1. ed. Planaltina-DF, n. 58, p.16, 2002.

ARAÚJO, L. W.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J. L. MARCONI, J.; SOBRAL, J. K.; LAÇAVA, P. T. **Isolamento de microrganismos endofíticos**. USP, Piracicaba, 2002. 86 p.

ASGHAR, H.N.; ZAHIR, Z.A.; ARSHAD, M. & KHALIQ, A. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promotiong activies in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, n. 35, p. 231-237, 2002.

AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) **Ecologia microbiana**. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, p. 117-137, 1998.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, p. 549-579, 2005.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. D. L.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 911-92, 1997.

BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF Group 1) as species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 802-810, 1996.

BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. A brief story of nitrogen fixation in sugarcane – reasons for success in Brazil. **Functional Plant Biology**, v. 29, p. 147-423, 2002.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J.C.; TURK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BRIC, J. M.; BOSTOCK, R. M.; SILVERSTONE, S. E. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 535-538, 1991.

CARRIM, A. J. I.; BARBOSA, E. C.; VIEIRA, J. D. G. Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, p. 353-359, 2006.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO DO ESTADO DE GOIAS. **Avaliação da Safra Agrícola de Cana-de-açúcar**. Primeiro levantamento, safra 2012/2013, Abril/2012 Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_04_10_09_19_04_boletim_de_cana.pdf>. Acesso em: 01 jul. 2012.

COSTA, M. G. C.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; OTONI, W. C. Importância das contaminações e dos microrganismos endêmicos na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. In: SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. (Ed.) **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, Brasília 2010. v. 1, cap. 1, p. 17-89, 2010.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, p. 107-149, 2003.

GILLIS, M.; DÖBEREINER, J.; POT, B.; GOOR, M.; FALSEN, E.; HOSTE, B. E.; KERSTERS, K. Taxonomy relationship between *Pseudomonas rubrisubalbicans*, some clinical isolates (EF group I), *Herbaspirillum seropedicae* and *Aquaspirillum autotrophicum*. In: POLSINELLI, M.; MATERASSI, R.; VICENZINI, M. (Ed.). Nitrogen fixation. **Development in Plant and Soil Sciences**. Dordrecht: Academic Publishers, v. 48, p. 292-294. 1991.

GILLIS, M.; KERSTERS, K.; HOSTE, B.; JANSSENS, D.; KROPPESTEDT, R. M.; STEPHAN, M. P.; TEIXEIRA, K. R.S.; DOBEREINER, J. DE LEY J. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. **Intenacional Journal of Systematic Bacteriology**, v. 39, n. 3, p. 361-364, 1989.

GOLDSTEIN, A. H. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. **American Journal of Alternative Agriculture**, v. 1, p. 51-57, 1986.

GRANT, C. A.; FLATEN, D. N.; TOMASIEWICZ, D. J. & SHEPPARD, S. C. A importância do fósforo no desenvolvimento inicial da planta. **Informações Agrônomicas**, 95: 1-6, 2001.

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

GYANESWAR, P.; KUMAR, G. N.; PAREKH, L. J.; POOPLE, P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 245, p. 83-93, 2002.

HALDO-ALIJA, L. Identification of indole-3-acetic acid producing freshwater wetland rhizosphere bacteria associated with *Juncus effusus* L. **Cambridge Journal of Microbiology**, v. 49, p. 781-787, 2003.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v. 67, p. 597-607, 1975.

HANKIN, L.; ZUCKER, M.; SANDS, D. C. Improved solid medium for detection and enumeration of pectolytic bacteria. **Applied of Microbiology**, v. 22, p. 205-209, 1971.

KATZNELSON, H.; BOSE, B. Metabolic activity and phosphate-dissolving capability of bacterial isolates from wheat root, rhizosphere and non-rhizosphere soil. **Canadian Journal of Microbiology**, v.5, p.79-85, 1959.

KNEIFEL, W.; LEONHARDT, W. Testing of different antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 29, p. 139-144, 1992.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W. L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. & AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v. 6, p. 1244-1251, 2004.

KUSS, A.V.; KUSS, V. V; LOVATO, T. & FLÔRES, M. L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 1459-1465, 2007.

LIU, L. J. Biotechnology: its potential importance for controlling sugar cane diseases in Latin America and the Caribbean. In: **Inter-America Sugar Cane Seminar**, Proceedings. [s.n.], p. 332-335. 1989.

LUVIZOTTO, D. M. **Caracterização fisiológica e molecular de *Burkholderia* spp. associada às raízes de cana-de-açúcar**. 2008, 94 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

MENDES, R. **Diversidade e caracterização genética de comunidades microbianas endofíticas associadas à cana-de-açúcar**. Tese (Doutorado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 119 p, Piracicaba, 2008.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, 15: 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 and Soil**, Dordrecht, v. 242, p. 205-215, 2002.

POLESI, N. P. E. **Investigação da microbiota endofítica onipresente em microplantas “axênicas”**. 2010. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Fisiologia e Bioquímica de Plantas). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

REED, B. M.; MENTZER, J.; TANPRASERT, P. & YU, X. Internal bacterial contamination of micropropagated hazelnut: identification and antibiotic treatment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 52, p. 67-70, 1998.

RENEWICK, A.; CAMPBELL, R. & COE, S. Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. **Plant Pathology**, v. 40, p. 524-532, 1991.

ROSENBLUETH, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. **Bacterial endophytes and their interactions with hosts**. Molecular Plant and Microorganisms Interactions, v. 8, p. 827-837, 2006.

RYU, E. A simple method for differentiation between Gram-positive and Gram-negative organisms without staining. **Kitazato Archives of Experimental Medicine**, Tokyo, v. 17, p. 58-63, 1940.

RYU, E. On the gram-differentiation of bacteria by simplest method. **Journal of Japanese Society for Veterinary Science**, v. 17, p. 31- 35, 1938.

SAMANTA, R.; PAL, D. & SEM, S.P. Production of hydrolases by N₂-fixing microorganisms. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, v. 185, p. 75-81, 1989.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. & COSTA, F. H. **Estratégias de seleção e uso de substâncias químicas antimicrobianas para o controle de contaminantes na cultura de tecidos de plantas**. In: Jonny Everson Scherwinski-Pereira (Ed.) Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, pp. 261-292, 2010.

SIERRA, G. A. A simple method for the detection of lypolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contacts between cells and fatty substracts. **Antonine van Leeuwenhoeck Journal**, v.28, p. 15-22, 1957.

STIERLE, A.; STROBEL, G. A.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae* an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, v. 260, p. 214-216, 1993.

STROBEL, G. A. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, p. 315-333, 2002.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potential hole in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 19, p. 1-30, 2000.

TORRES, A. C.; TEIXEIRA, S. L.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: TORRES, A. C; CALDAS, L. S.; BUSO J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. 1. ed. Brasília: Embrapa, 1988. v. 1, p. 183-185.

VASSILEV, N. & VASSILEVE, M. Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, p. 435-440, 2003.

VERNA, S. C.; LADHA, J. K. & TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water Rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 127-141, 2001.

VIEIRA, J. D. G. Purificação e caracterização de uma α -amilase de *Streptomyces* sp. 1999 Tese (Doutorado em: Microbiologia). Universidade de São Paulo, Brazil, 1999. USP, p. 116.

ZAKHAROVA, E. A.; SHCHERBAKOV, A. A.; BRUDNIK, V. V.; SKRIPKO, N. G.; BULKHIN, N. S. & IGNATOV, V. V. Biosynthesis of indol-3-acetic acid in *Azospirillum brasiliense*: insights from quantum chemistry. **European Journal of Biochemistry**, v. 259, p. 572-576, 1999.

5 MICROPROPAGAÇÃO DE CULTIVARES DE CANA-DE-AÇÚCAR A PARTIR DO CULTIVO DE ÁPICES CAULINARES *IN VITRO*

RESUMO

O uso de técnicas de cultura de tecidos, como a micropropagação, tornou-se o meio mais eficiente para a produção de mudas de variedades de cana-de-açúcar sadias, em larga escala e em tempo reduzido, acelerando o processo de melhoramento e comercialização. Estudos foram realizados para avaliar o efeito de reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de culturas de ápices caulinares e seu enraizamento em três variedades de cana: RB98710, RB034041 e RB034130. Ápices caulinares com aproximadamente 1,5 cm de comprimento foram usados como fonte de explantes. Os explantes foram excisados, cuidadosamente esterilizados e inoculados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) líquido contendo BAP, KIN, ANA e GA₃ em diferentes combinações e concentrações. Os resultados mostraram que o meio MS com 0,2 mg.L⁻¹ de BAP e 0,1 mg.L⁻¹ de KIN, suplementado ou não com 0,1 mg.L⁻¹ de ANA e 0,1 mg.L⁻¹ de GA₃, são os mais apropriados para a maior produção de brotos nas variedades RB98710 e RB034130 e RB034041. Entretanto, a melhor taxa de multiplicação foi observada em meio MS suplementado apenas com 0,2 mg.L⁻¹ de BAP para a variedade RB034041. Os melhores resultados de enraizamento das plântulas para todas as três variedades foram obtidos em meio MS com metade da concentração de macronutrientes, contendo 0,6% de ágar, 6% de sacarose, 5,0 mg.L⁻¹ de NAA e 0,2% de carvão ativado. As plântulas foram aclimatizadas e a capacidade de sobrevivência sob condições *ex vitro* foi de 90%, três semanas após a transferência para a casa de vegetação.

Palavras-chave: reguladores de crescimento, cultura de tecidos, meristemas

ABSTRACT

MICROPROPAGATION OF SUGARCANE VARIETIES FROM *IN VITRO* SHOOT TIP CULTURE

The use of tissue culture techniques, such as micropropagation, has become the most efficient way to produce seedlings of sugarcane varieties healthy, in large scale and in less time, speeding up the process of improving and marketing. Studies were carried out to study the effect of growth regulators on *in vitro* multiplication of shoot cultures and their rooting in three sugarcane varieties *i.e.*, RB98710, RB034041 and RB034130. Shoot tip explants with about 1.5 cm long were used as explant source. The explants were excised, carefully sterilized and inoculated on liquid MS (Murashige & Skoog, 1962) medium

containing BAP, KIN, NAA and GA₃ in various combinations and concentrations. The results showed that MS medium with 0,2 mg.L⁻¹ BAP and 0,1 mg/L KIN, supplemented or not with 0,1 mg.L⁻¹ NAA and 0,1 mg/L GA₃, were most suitable for producing optimum number of shoots in RB98710, RB034130 and RB034041 varieties. However, optimum multiplication was observed on MS medium supplemented only with 0,2 mg.L⁻¹ BAP for variety RB034041. Best rooting of the plantlets for all three varieties was obtained on half strength MS medium containing 0,6% agar, 6% sucrose, 5.0 mg.L⁻¹ NAA and 0,2% of activated charcoal. The sugarcane plantlets were acclimatized in greenhouse and the survivability under *ex vitro* condition was up to 80% three weeks after transferring them.

Keywords: growth regulators, tissue culture, meristems

5.1 INTRODUÇÃO

Comercialmente, a cana é propagada a partir de colmos com cada colmo contendo duas a três gemas. Após o lançamento de uma nova variedade no mercado, um gargalo tecnológico importante é a propagação da nova variedade em larga escala. O tempo necessário e a contínua contaminação por doenças sistêmicas são graves problemas encontrados por produtores no momento de multiplicar um genótipo elite de cana no campo (Nand & Singh, 1994).

Variedades comerciais modernas são obtidas através de programas de seleção e melhoramento durante um período de tempo que pode variar entre 8-10 anos (Cesnik & Mioque, 2004). Durante os últimos trinta anos, a micropropagação e outras técnicas *in vitro* têm se tornado mais amplamente utilizadas na horticultura comercial e na agricultura para a propagação em massa de plantas cultivadas (Das et al., 1996; Cruz et al., 2009). No melhoramento de cana-de-açúcar, técnicas de cultura de tecidos têm sido amplamente utilizadas para a micropropagação em grande escala e podem efetivamente reduzir o período de tempo entre as fases de seleção e a liberação comercial de novas variedades (Lorenzo et al., 2001; Taylor, 1997).

A micropropagação é, atualmente, o meio mais eficiente e rápido de produção em larga escala de variedades de cana-de-açúcar livres de doença a fim de acelerar o processo de melhoramento e comercialização (Lee, 1987; Taylor & Dukie, 1993; Feldmenn et al., 1994; Lorenzo et al., 2001; Kievitsbosch, 2011). Em contraste com o método convencional, onde uma gema produz 4-5 brotos, a utilização de técnicas de cultura de tecidos, em estimativas conservadoras, pode produzir cerca de 10.000 plantas idênticas a partir de uma única gema em cerca de 3-4 meses (Lee, 1987).

A micropropagação também pode ser usada para a limpeza clonal de variedades de importância comercial. Na literatura, há inúmeros trabalhos descrevendo diferentes protocolos para a regeneração de plantas de cana por meio de cultura de calos, ápices caulinares, gemas laterais, meristemas (Hendre et al., 1975; Hendre et al., 1983; Lee 1986, 1987; Comstock, 1988; Feldman et al., 1989; Srinivasan & Sreenivasan, 1992; Hu & Wang 1983; Lal and Singh, 1994; Gosal et al., 1998; Sood et al., 1999; Jadhav et al., 2001; Baksha et al., 2002).

Um dos grandes obstáculos para a micropropagação é a interação genótipo/ambiente *in vitro* (considerando o ambiente *in vitro* o tipo de meio de cultura, concentrações de reguladores de crescimento, tipo de frasco, iluminação, temperatura, etc.) e o enraizamento das plântulas formadas no laboratório. A cana é uma cultura altamente heterozigota, poliplóide e aneuplóide (Jannoo et al., 1999) e, como consequência, a grande influência do tipo de explante e do genótipo sobre o crescimento de cana-de-açúcar em condições *in vitro* (Mulleegadoo e Dookun, 1999). A taxa de multiplicação de novos brotos *in vitro* a partir de ápices caulinares, por exemplo, varia muito na maioria das variedades de cana (Siddiqui et al., 1994). Embora avanços consideráveis em sistemas de cultura de tecidos para a micropropagação tenham ocorrido como o desenvolvimento de biorreatores e o surgimento de lâmpadas LED (*Light Emitting Diode*), o estabelecimento do melhor protocolo de micropropagação ainda é algo que deve ser ajustado dependendo da variedade de cana selecionada.

No presente estudo, foram testadas diferentes concentrações e combinações de reguladores de crescimento para o estabelecimento de protocolos de micropropagação para três variedades de cana: RB98710, RB034041 e RB4130, que ajudarão a lidar com a crescente demanda por produção de cana em larga escala disponibilizando uma tecnologia economicamente viável e tecnicamente possível.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) e nas casas de vegetação do ICB e da Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás em Goiânia, Brasil.

5.2.1 Material vegetal

A variedade RB98710 e os clones experimentais RB034041 e RB034130 utilizadas neste estudo, foram selecionadas, por pertencerem ao programa de melhoramento de cana-de-açúcar da UFG/RIDESA e apresentarem possibilidade de vir a compor o rol de variedades com potencial de lançamento para o estado de Goiás. Os materiais vegetais são provenientes do jardim clonal mantido pelo programa na Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da UFG, Goiânia, GO.

5.2.2 Descontaminação

Ápices caulinares provenientes do jardim clonal da EAEA/UFG foram submersos em solução de Kasumin[®] (3 mL.L⁻¹) por 12 horas para desinfestação. A seguir foram transportados para estufa e plantados em sementeiras contendo areia lavada e esterilizada. Assim que os brotos atingiram 30 cm de altura, foram coletados para a retirada do ápice caulinar. Após a retirada dos limbos foliares, os palmitos com cerca de 6 a 8 cm foram mergulhadas em solução de hipoclorito de sódio 50% (cloro ativo a 1,25%) por 15 minutos e lavados três vezes com água estéril para a remoção do cloro. Na sequência foram mergulhados em solução de Kasumin[®] 4 mL.L⁻¹ por 2h, lavados três vezes com água estéril e novamente tratados em solução de hipoclorito de sódio 50% (cloro ativo a 1,25%) por 15 min. Após tríplex lavagem com água estéril, e em câmara de fluxo laminar, os ápices caulinares foram esterilizados superficialmente em etanol 70%, (v/v) durante 1 minuto e na sequência em solução de hipoclorito de sódio 25% (cloro ativo a 0,625%) durante 15 minutos e a seguir foram lavados três vezes com água estéril antes da inoculação.

5.2.3 Experimento de multiplicação

Após a descontaminação os explantes foram inoculados em tubos de ensaio devidamente etiquetados, contendo meio de cultura estéril. O meio de cultura comum a todos os tratamentos foi o meio MS (Murashige & Skoog, 1962) líquido modificado, contendo ácido cítrico (150 mg.L⁻¹), tiamina (1,0 mg.L⁻¹), inositol (100 mg.L⁻¹), e antibiótico clavulin[®] (0,5 g.L⁻¹), sacarose (20 g.L⁻¹). Este meio básico foi suplementado

com diferentes combinações e concentrações de reguladores de crescimento estabelecendo seis tratamentos descritos na Tabela 5.1. O pH de todos os tratamentos foi ajustado para 5,8 e autoclavados a 120°C a 1 atm, por 20 minutos. Após a inoculação os tratamentos permaneceram em câmara de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 1°C. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 12 repetições, em que cada parcela consistiu de um frasco com 10 ml de meio e 1 explante. A avaliação do número de brotos, tamanho do maior broto e a presença de raízes foi realizada ao final de 30 dias.

Tabela 5.1. Diferentes combinações de KIN, BAP, ANA E GA₃ em teste de brotação em três cultivares de cana-de-açúcar.

Tratamentos	KIN	BAP	ANA	GA ₃
	mg/L			
T1	0,10	-----	-----	-----
T2	-----	0,20	-----	-----
T3	0,10	0,20	-----	-----
T4	0,10	0,20	0,10	-----
T5	0,10	0,20	-----	0,10
T6	0,10	0,20	0,10	0,10

5.2.4 Experimento de enraizamento

Plântulas obtidas *in vitro*, com 4 a 5 cm de altura, foram inoculadas em meios de enraizamento. Cinco tratamentos foram testados utilizando o meio MS modificado utilizado no experimento de multiplicação, porém, com metade da concentração de macronutrientes (Tabela 5.2). O pH de todos os tratamentos foi ajustado para 5,8 e autoclavados a 120°C a 1 atm, por 20 minutos. Após a inoculação os tratamentos permaneceram em câmara de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 1°C. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 12 repetições, em que cada parcela consistiu de um frasco com 20 ml de meio e 1 explante. A avaliação da presença de raízes, do tamanho da maior raiz, do número de brotos e do tamanho da plântula foi feita ao final de 30 dias.

Tabela 5.2. Diferentes combinações de meio líquido, sólido, ANA e carvão ativado em enraizamento de brotos em três cultivares de cana-de-açúcar.

Tratamentos	MS 50% + 6% sacarose	ANA	Carvão ativado
T1	Líquido	-----	-----
T2	Sólido	-----	-----
T3	Líquido	5 mg/L	-----
T4	Sólido	5 mg/L	-----
T5	Sólido	5 mg/L	0,2%

5.2.5 Análise estatística

A normalidade dos dados obtidos para os tratamentos foi testada pelo teste de Lilliefors. Os tratamentos foram comparados por análise de variância ANOVA, seguido por teste Tukey quando paramétricos ou por análise de variância pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de testes de comparações múltiplas (Teste de Student-Newman-Keuls ou de Dunn) na ausência de normalidade ou homogeneidade de variâncias. Todos os testes foram realizados ao nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram conduzidas com auxílio dos softwares Biostat[®] 5.0 (Ayres et al., 2007).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Experimentos de multiplicação

5.3.1.1 Número de brotos

O número médio de perfilhos por explante variou de 4,41 a 15,33, aos 42 dias de repicagem. O maior valor observado foi de 15,33 perfilhos para a variedade RB034130 em T2, enquanto o menor valor foi observado para a variedade RB98710 em T1. Para o estímulo de novas brotações a interação entre KIN e BAP demonstrou ser eficiente para as três variedades testadas (Figura 5.1). Os tratamentos contendo estes dois reguladores de crescimento sempre estiveram entre as maiores médias e sem diferenças significativas

entre si. Quando isoladas, as duas citocininas não apresentaram bons resultados, excetuando-se o tratamento T2 com a variedade RB034130 (Tabela 5.3).

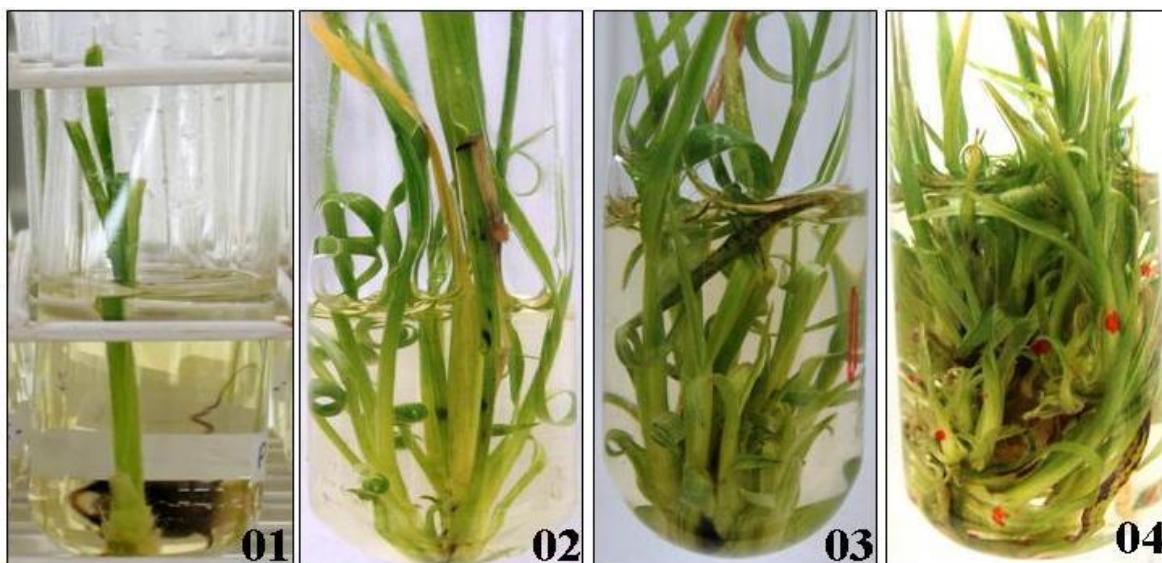


Figura 5.1 - Teste de brotação com ápices caulinares da variedade RB034130 em meio MS líquido. **01)** Cana recém-inoculada; **02)** brotação após 14 dias; **03)** brotação após 28 dias; **04)** brotação após 42 dias.

Porém, maiores concentrações de auxinas podem inibir as brotações e favorecer o enraizamento ou a formação de calo (Grattapaglia & Machado, 1998; Santos et al. 2003; Souza & Junghans, 2006).

O tipo e a concentração de reguladores de crescimento são fatores determinantes no padrão de desenvolvimento no cultivo *in vitro* (Hartmann et al. 2002). As citocininas são responsáveis pela quebra de dormência apical e indução de proliferação de gemas axilares em explantes cultivadas *in vitro*. A reação de um tecido *in vitro* depende do balanço entre auxinas e citocininas. (Hartmann et al. 2002).

Resultados indicando tratamentos com a interação entre KIN e BAP foram relatados por Khan et al. (2009) e Hendre et al. (1983) na indução de multiplicação de brotos a partir de ápices caulinares de cana. Os autores também observaram diferenças na resposta das variedades testadas sendo as melhores concentrações de BAP variando entre 0,5-1,5 mg.L⁻¹ com KIN 0,1-0,5 mg.L⁻¹. Gosal et al. (1998) obtiveram rápida multiplicação de brotos em meio MS líquido suplementado com citocininas KIN (0,5 mg.L⁻¹) e BAP (0,5 mg.L⁻¹) com 20 brotos por planta.

Tabela 5.3. Efeito de diferentes combinações de KIN, BAP, ANA E GA₃ em teste de brotação em três cultivares de cana-de-açúcar.

Cultivares	RB 98.710		RB 03.4130		RB 03.4041	
Número de brotos.						
T1	4,4167	b	8,3333	ab	6,9167	ns
T2	7,8333	ab	15,3333	a	7,6364	ns
T3	9,8333	a	13,2500	ab	7,4167	ns
T4	10,7500	a	6,7500	b	9,5000	ns
T5	10,4167	a	15,0909	a	11,4167	ns
T6	9,9167	a	12,1667	ab	9,3333	ns
Tamanho do maior broto.						
T1	108,8889	a	59,0833	b	97,0000	ns
T2	51,4167	b	65,3333	ab	75,8000	ns
T3	94,4167	a	73,5455	ab	72,6000	ns
T4	79,5833	ab	84,9167	a	108,9167	ns
T5	82,3333	a	61,1000	ab	95,5000	ns
T6	78,0000	ab	72,0000	ab	105,4167	ns
Presença de raízes.						
T1	1,0000	ns	1,0000	a	1,0000	a
T2	0,7500	ns	0,2500	b	0,2727	b
T3	0,9167	ns	0,1667	b	0,0833	b
T4	0,8333	ns	0,4167	ab	0,5000	ab
T5	0,8333	ns	0,1818	b	0,3333	ab
T6	0,8333	ns	0,1667	b	0,2500	b

T1 = 0,1 mg/L KIN, **T2** = 0,2 mg/L BAP, **T3** = 0,1 mg/L KIN, + 0,2 mg/L BAP, **T4** = 0,1 mg/L KIN, + 0,2 mg/L BAP + 0,1 mg/L ANA, **T5** = 0,1 mg/L KIN, + 0,2 mg/L BAP + 0,1 mg/L GA₃, **T6** = 0,1 mg/L KIN, + 0,2 mg/L BAP + 0,1 mg/L ANA, + 0,1 mg/L GA₃. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey no nível de 5%.

Neste trabalho, o efeito de interação entre as variedades e as diferentes combinações de hormônios para o número de perfilhos não foi significativa ($p > 0,05$) (Tabela 5.3). Embora Geetha et al. (2000) obtiveram altas taxas de multiplicação em cana de açúcar em meio MS suplementado com apenas 1 mg.L⁻¹ de BAP. Patel et al. (2001) obteve os melhores resultados com MS suplementado com 1,5 mg.L⁻¹ KIN. Da mesma forma, Mamun et al. (2004) utilizaram BAP a 1.5 mg.L⁻¹ para obter maiores percentagem de proliferação de brotos.

Wongkaew & Fletcher (2004) relataram a multiplicação de brotos em cana utilizando 0,5 mg.L⁻¹ de BAP, juntamente com 0,5 mg.L⁻¹ de ANA e 15% água de coco (v/v). A citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) é a mais utilizada, induzindo a formação de grande número de brotos e alta taxa de multiplicação (Grattapaglia & Machado, 1998). No entanto, o ácido naftaleno acético (ANA) e o ácido indolbutírico (AIB) são as auxinas comumente utilizadas no meio de multiplicação de muitas espécies. Embora nem sempre

sejam necessárias no meio de multiplicação, as auxinas são utilizadas no intuito de estimular o crescimento das partes aéreas (Leite, 1992; Huang et al. 1994; Campos & Pais, 1996).

Embora sem diferenças significativas com os outros melhores tratamentos para número de brotos para a variedade RB034041, aparentemente, a ação de GA₃ foi importante nesta variedade exibindo a maior média (Tabela 5.1). Chattha et al. (2001) relatou que a formação de brotos foi excelente com BAP 1,5 mg.L⁻¹, em combinação com 1,5 mg.L⁻¹ de GA₃ e principalmente no número de folhas com no máximo 16 folhas por planta.

5.3.1.2 Tamanho de brotos

Para a variável tamanho do maior broto, não houve diferença significativa entre os tratamentos para a variedade RB034041. Destaca-se neste experimento a oposição de resultados para o tratamento T4 (KIN + BAP + ANA) que obteve a maior média com a RB98710 e a menor média com a RB034130. No geral, as médias obtidas para os melhores tratamentos não possuem diferenças significativas entre as três variedades. Novamente, a interação entre KIN e BAP demonstrou ser eficiente quando comparadas com as citocininas agindo separadamente (Tabela 5.3).

As brotações obtidas *in vitro* que apresentem pequeno comprimento podem apresentar baixo percentual de enraizamento prejudicando a fase de aclimatização (Silva, 2004). Uma das formas de estimular o crescimento das brotações é através da adição do GA₃ ao meio de cultura. O GA₃ estimula a divisão e alongamento das células, o qual promove o aumento do comprimento das brotações (Torres et al., 1998). Porém, para as três variedades selecionadas, a adição de GA₃ ao meio não resultou em maior crescimento. Razi-ud-Din et al. (2004) relataram maiores médias de crescimento por broto em meio MS contendo 1,5 mg.L⁻¹ GA₃ e 0,5 mg.L⁻¹ de BAP. Para Khan et al. (2009) os comprimentos máximos obtidos foram observados em meio MS com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP em combinação com 0,1 mg.L⁻¹ GA₃ em 30 dias. Os autores indicaram diferenças significativas para o comprimento médio da parte aérea de brotos entre as variedades testadas.

5.3.2 Experimentos de enraizamento

Para as três variedades selecionadas não houve diferença estatística na indução de raízes entre os cinco tratamentos testados (Figura 5.2). A diferença entre os tratamentos ocorreu para a variável: tamanho da maior raiz, obtida após 30 dias de experimento. Nas variedades RB98710 e RB034130 o meio T5 (sólido com ANA e carvão ativado) foi o que apresentou as maiores médias. Para a variedade RB034041 o tratamento T5 obteve a segunda maior média, embora não seja significativamente diferente dos tratamentos T2 (sólido) e T1 (líquido) (Tabela 5.4).

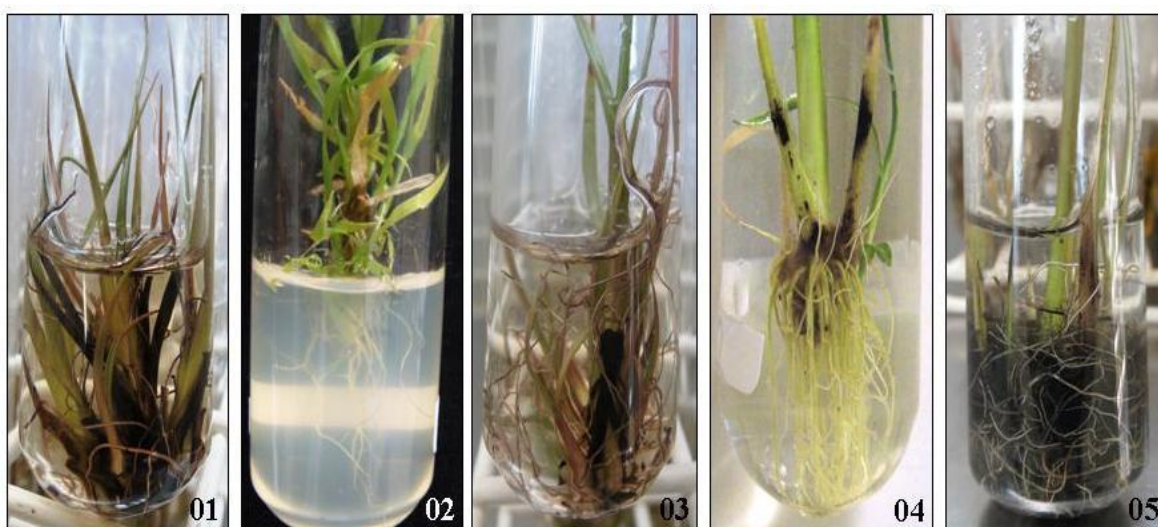


Figura 5.2 - Explante de cana-de-açúcar, brotações, da variedade RB034130, em todos os tratamentos foi utilizado o meio MS com metade da concentração, suplementado com 6% de sacarose. **01)** T1 meio líquido; **02)** T2 meio sólido; **03)** T3 meio líquido + 5 mg ANA; **04)** T4 meio sólido 5 mg ANA; **05)** T5 meio sólido + 5 mg ANA + 2g de carvão.

Singh et al. (2001) obteve enraizamento de brotações de diferentes variedades de cana obtidas *in vitro* entre 7-15 dias após inoculação. Os autores utilizaram meio MS com metade da concentração de macronutrientes contendo altas concentrações de ANA e sacarose. O número de dias necessários para o enraizamento variou de variedade para variedade, mas obtiveram resultados de enraizamento entre 75-95% das brotações entre as variedades testadas.

Tabela 5.4 Efeito de diferentes combinações de meio líquido, sólido, ANA e carvão ativado em enraizamento de brotos em três cultivares de cana-de-açúcar.

Cultivares	RB 98.710		RB 03.4130		RB 03.4041	
Presença de raiz.						
T1	1,0000	ns	1,0000	ns	1,0000	ns
T2	1,0000	ns	1,0000	ns	1,0000	ns
T3	1,0000	ns	1,0000	ns	1,0000	ns
T4	1,0000	ns	1,0000	ns	1,0000	ns
T5	0,8333	ns	1,0000	ns	1,0000	ns
Tamanho maior da raiz						
T1	27,4167	ab	28,9167	bc	38,5455	ab
T2	20,4167	bc	40,5000	b	48,9167	a
T3	13,7500	cd	30,0833	bc	24,0000	bc
T4	7,2500	d	17,0833	c	11,9091	c
T5	32,6364	a	59,6667	a	43,3333	a
Número de brotos						
T1	1,7500	ab	8,9167	ab	6,2727	ab
T2	2,7500	a	6,4167	b	6,3333	ab
T3	2,5833	a	10,7500	a	8,3333	a
T4	2,7500	a	8,8182	ab	6,2727	ab
T5	0,6364	b	5,3333	b	3,1667	b
Tamanho do explante						
T1	245,4167	a	124,5833	ab	232,3636	a
T2	173,5833	bc	148,6667	a	164,4545	ab
T3	239,8182	ab	101,0000	b	138,4167	b
T4	159,3333	c	148,0000	ab	185,4545	ab
T5	171,3636	bc	142,5833	ab	203,8333	ab

T1 = Meio líquido, T2 = meio sólido, T3 = meio líquido + 5,0 mg/L ANA, T4 = meio sólido + 5,0 mg/L ANA, T5 = meio sólido + 5,0 mg/L ANA + carvão ativado. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de *Tukey* no nível de 5%.

Não houve diferença significativa nos resultados de enraizamento entre meios solidificados com ágar, e meios líquidos (Tabela 5.4). Tem-se observado que o sistema radicular formado nas brotações cultivadas em meio de cultura sólido é quebradiço e não possui pêlos radiculares. A utilização do meio de enraizamento líquido, além de facilitar a inoculação e o manuseio dos explantes, reduz o custo do meio de cultura

O destaque do meio T5 para o desenvolvimento radicular das brotações pode estar relacionado com a presença do carvão ativado. A presença no carvão no meio de

cultura funciona como uma barreira para a penetração da luz no meio e a luminosidade é um dos fatores ambientais envolvidos na indução do enraizamento (Assis & Teixeira, 1998). A alta luminosidade propicia maior produção de ácido abscísico e substâncias fenólicas inibitórias do enraizamento (Anderson, 1984). Porém, devido a sua capacidade de adsorção, o carvão ativado pode modificar a composição dos meios de cultura, adsorvendo, por exemplo, substâncias promotoras de enraizamento como o ANA, modificando sua concentração.

A presença de raízes em todos os tratamentos testados, incluindo aqueles sem a adição de auxina ao meio de cultivo (T1 e T2) indica que estas variedades podem apresentar uma quantidade de auxina endógena suficiente para estimular o enraizamento, não respondendo, portanto, à adição de auxina exógena.

Da análise do tamanho das raízes, constatou-se que a adição de auxina ao meio de cultivo nos tratamentos T3 e T4 diminuiu o tamanho das raízes obtidas nas três variedades (Tabela 5.2). Diversas espécies, principalmente as herbáceas, enraízam com níveis muito reduzidos de auxina ou em meio básico sem substâncias de crescimento (Hasegawa, 1980; Anderson, 1984). Nesse caso, as partes aéreas em rápido crescimento são fontes de intensa produção de auxina, a qual é translocada para a base, estimulando a rizogênese (Grattapaglia & Machado, 1998). Provavelmente, a ação do carvão ativado no meio T5 foi efetiva na redução da intensidade de luz na região de formação de raízes e na obtenção da melhor concentração de auxinas para a indução de raízes nas brotações de cana.

Entre as três variedades selecionadas, o desenvolvimento de raízes ocorreu após 15 dias em todos os tratamentos avaliados. Este período foi relativamente rápido quando comparado com outros trabalhos de enraizamento de brotações de cana obtidas *in vitro*. Nestes trabalhos, o número de dias necessários para o enraizamento variou de 4 a 6 semanas (Sreenivasan & Sreenivasan, 1992; Sood et al., 1999; Pawar et al., 2002). O fato das raízes obtidas em alguns explantes terem tamanho médio inferior 30 mm no momento da transferência para a aclimatização também não causou perdas significativas. Após três semanas de aclimatização, o índice de perdas para as três variedades ficou abaixo dos 10%. De acordo com Grattapaglia & Machado (1998), raízes mais curtas são mais adequadas para o transplântio, devido às mesmas se encontrarem em fase de crescimento ativo e por evitarem a quebra no momento da retirada do meio de cultura. Conforme Rocha et al. (2006) o tamanho adequado das raízes é de aproximadamente 20 a 30 mm, pois raízes

maiores tendem a enovelar entre si dependendo do diâmetro do frasco e do número de explantes cultivados no mesmo. Este foi o problema encontrado no presente trabalho com os explantes crescendo em tubos de ensaio.

5.4 CONCLUSÕES

- Tanto para a indução de brotações quanto para o crescimento dos brotos, os tratamentos contendo a presença de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ KIN e $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP obtiveram os melhores resultados para as variedades RB98710 e RB034130. Para a variedade RB034041 não houve diferença significativa entre os tratamentos para estas variáveis, embora o tratamento T6, com a presença do GA_3 , tenha obtido a maior média no número de brotos e a segunda maior média no crescimento dos brotos.
- A indução de raízes ocorreu em todos os tratamentos testados, sem diferenças estatísticas entre eles. Porém, o tratamento T5 (MS 50% sólido + 6% sacarose + 5 mg.L^{-1} de ANA + 0,2% de carvão ativado) destacou-se no crescimento de raízes nas três variedades selecionadas.

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, W. C. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of *Rhododendron*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 109, p. 343-347, 1984.

ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C. CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa- CNPH, 1998. v. 1, p.183-260.

AYRES, M.; AYRES-Jr, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S.: **BioEstat 5.0** - Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biomédicas. 4 ed. Brasília: Sociedade Civil Mamirauá/ MCT-CNPq, 2007. 364 p.

BAKSHA, R.; ALAM, R.; KARIM, M. Z.; PAUL, S. K.; HOSSAIN, M. A.; MIAH, M. A. S. and RAHMAN, A. B. M. M. In vitro shoot tip culture of sugarcane (*Saccharum officinarum*) Variety Isd 28. **Biotechnology**, Pabna, v.1, n. 2-4, p. 67-72, 2002.

CAMPOS, P. S.; PAIS, M. S. In vitro micropropagation of the macaronesiar evergreen tree *Persea indica* (L.) K, Spreng. **In vitro Cellular Developmental Biology**, v. 32, p. 184-189, set. 1996.

CESNIK, R.; MIOCQUE, J. **Melhoramento da cana-de-açúcar**. Embrapa Informações tecnológicas, Brasília, 2004, 307 p.

CHATTHA, M. A.; IMRAN, M. I.; ABIDA, A.; MUHAMMAD, I.; AKHTAR, A. Micropropagation of sugarcane (*Saccharum sp.*). **Pakistan Sugar Journal**, v. 16, p. 2-6, 2001.

COMSTOCK, J. C. Micropropagation plantlet project. Laboratory production, nursery operation and field aspects. Haw. Sug. Technol. Proceedings of the 47th Annual Conference of Hawaiian Sugar Technologists, **summaries**. Honolulu, p. 38-39, 1988.

CRUZ, M. A. L.; SILVA, A. D. C.; VEIGA, C. F. M.; SILVEIRA, V. Biofábricas para produção de mudas por micropropagação: estratégia para o aumento da produtividade de cana-de-açúcar no Rio de Janeiro. **Revista Científica Internacional**, ano 2, nº 05, 2009. 18 p. Disponível em: <<http://www.interscienceplace.org/interscienceplace/article/download/50/55>>. Acesso em: 15 fev. 2012.

DAS, S.; JHA, T. B.; JHA, S. Strategies for improvement of cashewnut through Tissue Culture. In: **Plant Tissue Culture**. Islam AS (ed.) Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd, p. 1-7, 1996.

FELDMAN, P.; FEREOL, L.; ROTT, P. In vitro culture: A new tool for agricultural process in Guadeloupe. **Bulletin Agronomique des Antilles et de la Guyane**, p. 79-80, 1989.

FELDMAN, P.; SAPOTILLE, J.; GREDOIRE, P. and ROTT, P. Micropropagation of sugarcane. In: TEISSON C. (Ed.). **In vitro culture of tropical plants**. France. CIRAD, p. 15-17, 1994.

GEETHA, S.; PADMANABHAN, D.; MANUEL, W. W.; AYYAMPERUMAL, A. In vitro production of sugarcane plants. **Sugar Tech**, v. 2, n. 3, p. 47-48, 2000.

GOSAL, S. S.; THIND, K. L.; DHALIWAL, H. S. Micropropagation of sugarcane. An efficient protocol for commercial plant production. **Crop Improvement**, n. 2, p. 167-71, 1998.

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

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES-Jr, F. T. D.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. Prentice-Hall/Englewood Cliffs, New Jersey. 7th ed. Upper saddle River: Prentice Hall. 2002.

HASEGAWA, P. M. Factors affecting shoot and root initiation from cultured rose shoot tip. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 105, p. 216-220, 1980.

HENDRE, R. R.; IYER, R. S.; KOTWAL, M.; KHUPPE S. S.; MASCARENHAS, A. F. Rapid multiplication of sugarcane by tissue culture. **Sugarcane**, n. 1, p. 4-9, 1983.

HENDRE, R. R.; MASCARENHAS, A. F.; NADGIR, A. L.; PATHAK, M.; JAGANNATHAN, V. Growth of mosaic virus free sugarcane plants from apical meristems. **Indian Phytopath**, v. 18, n. 2, p. 175-178, 1975.

HU, C. Y.; WANG, P. J.; Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell cultures**. New York: Macmillan, 1983. v. 1, p. 177-227.

HUANG, F. H.; AL-KHAYRI, J. M.; GBUR, E. E. Micropropagation of *Acacia mearnsii*. **In vitro Cellular Developmental Biology**, v. 30, p.70-74, 1994.

JADHAV, A. B.; VAIDYA, E. R.; AHER, V. B. and PAWAR, A. M. *In vitro* multiplication of co-86032 sugarcane (*S. officinarum*) hybrid. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, n. 71, p. 113-15, 2001.

JANNOO, N.; GRIVET, L.; SEGIUN, M.; PAULET, F.; DOMAINGUE, R.; RAO, P. S.; DOOKUN, A.; D'HONT, A.; GLASZMANN, J. C. Molecular investigation of the genetic base of sugarcane cultivars. **Theor Appl Genet**, v. 99, p. 171-184, 1999.

KHAN, S. A.; RASHID, H.; CHAUDHARY, M. F.; CHAUDHARY, Z.; FATIMA, Z.; SIDDIQUI, S. U.; ZIA, M. Effect of cytokinins on shoot multiplication in three elite sugarcane varieties. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, n. 4, p. 1651-1658, 2009.

KIEVITSBOSCH, t. j.; **Cultivo *in vitro* e desenvolvimento pós-seminal de espécies de Bromeliaceae com potencial ornamental**. Piracicaba, 2011. 158p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo.

LAL, N. and SING, N. H. Rapid clonal multiplication of sugarcane through tissue culture: **Plant Tissue Culture**, n. 4, p. 1-7, 1994.

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

LEE, T. S. G. Multiplication of sugarcane by apex culture. **Tumalba**, n. 36, p. 231-235, 1986.

LEITE, D. **Micropropagação de pereira (*Pyrus* spp.) cultivar Carrick**. 1992. 78 f. Dissertação (Mestrado em Fruticultura) - Escola de Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1992.

LORENZO, J. C.; OJEDA, E.; ESPINOSA, A.; BORROTO, C. Field performance of temporary immersion bioreactor derived sugarcane plantys. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, n. 37, p. 803-806, 2001.

MAMUN, M. A.; SKIDAR, M. B. H.; PAUL, D. K.; REHMAN, M. M.; ISLAM, M. *In vitro* micropropagation of some important sugarcane varieties of Bangladesh. **Asian Journal of Plant Science**, v. 3, n. 6, p. 666-669, 2004.

MULLEEGADOO, K. D.; DOOKUN, A. Effect of explant source and genotype on growth of sugarcane in vitro. **Revue Agricole et Sucriere de l'Ile Maurice**, v. 78, p. 35-39, 1999.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, 15: 473-497, 1962.

NAND, L.; SINGH, H. N. Rapid clonal multiplication of sugarcane through tissue culture. **Plant Tissue Culture**, v. 4, p. 1-7, 1994.

PATEL, A. A.; PATEL, S. R.; PATEL, C. L.; PRAJAPATI, B. S. Effects of media composition on in vitro multiplication of sugarcane varieties. **Indian Journal Genet. Plant Breed**, v. 61, n. 1, p. 82-83, 2001.

PAWAR, S. V.; PATIL, S. C.; JAMBHALE, V. M.; NAIK, R. M.; MEHETRE, S. S. Rapid multiplication of commercial sugarcane varieties through tissue culture. **Indian Sugar**, v. 11, p. 183-186, 2002.

RAZI-UD-DIN, SALIM; SHAH, S.; WAQUS, H. S.; ALI, S.; ZAMIR, R. Micro-propagation of sugarcane through bud culture. **Sarhad Journal of Agriculture**, v. 20, p. 1, 2004.

ROCHA, P. S. G.; FACHINELLO, J. C.; SCHUCH, M. W.; BIANCHI, V. J.; CAMPOS, R. V. Efeito do ágar, vermiculita e sacarose no enraizamento do porta-enxerto cv. Mr. S. 2/5 in vitro. **Revista Científica Rural**, Bagé, v. 11, n. 1, p. 54-59, jan/jun., 2006.

SANTOS, C. G.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, E. Induction and biochemical analysis of callus obtained from leaf segments of *Coffea arabica* L. Cultivar Rubi. Ver. **Ciência Agrotécnica**, v. 27, p. 571-577, 2003.

SIDDIQUI, S. H.; KHAN, I. A.; KHATRI, A.; NIZAMANI, G. S. Rapid multiplication of sugarcane through micropropagation. **Pakistan. Journal Agricultural Research**, v. 15, p. 134-136, 1994.

SILVA, E. S. B. **Propagação in vitro de Prunus spp.** 2004, 115f. Tese (Doutorado em Fruticultura de clima Temperado) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPel. Pelotas, 2004.

SINGH, B.; YADAV, G. C.; LAL, M. An efficient protocol for micropropagation of sugarcane using shoot tip explant. **Sugar Tech**, v. 3, p. 13-116, 2001.

SOOD, N.; SRIVASTAVA, R.; GOSAL, S. S. In vitro multiplication and field evaluation of sugarcane. **Proc. S.T.A.I.**, v. 61, p. 3-9, 1999.

SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. **Introduction to plant micropropagation**. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical - Cruz das Almas. 2006.- 152 pp.

SREENIVASAN, T. V.; SREENIVASAN, J. Micropropagation of sugarcane varieties for increasing cane yield. SISSTA, **Sugar Journal**. v. 14, p. 61-64, 1992.

TAYLOR, P. W. J. Micropropagation of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid). In: **Biotechnology in Agriculture and forestry**, high-tech and Micropropagation v. (Ed.): Y.P.S. Bajaj. Springer-verlag, Berlin, v. 39, p. 256-271, 1997.

TAYLOR, P. W. J.; DUKE, S. Development of an in vitro culture technique for conservation of *Saccharum* sp. **Plant cell Tissue Organ Culture**, v. 34, p. 217-22, 1993.

TORRES, A. C.; TEIXEIRA, S. L.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: TORRES, A. C; CALDAS, L. S.; BUSO J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. 1. ed. Brasília: Embrapa, 1988. v. 1, p. 183-185.

WONGKAEW, P.; FLETCHER, J. Sugarcane white leaf phytoplasma in tissue culture, long term maintenance, transmission and oxytetracycline remission. **Plant Cell Reports**, v. 23, p. 426-434, 2004.

6 CONCLUSÕES GERAIS

- Para as variedades de cana-de-açúcar testadas, tempos e concentrações de etanol, hipoclorito de sódio, casugamicina e bicloreto de mercúrio controlaram a oxidação dos explantes e não foram fitotóxicos. Porém, não foram eficientes no controle da contaminação por bactérias endofíticas.
- A partir de explantes cultivados *in vitro*, treze isolados de bactérias endofíticas foram obtidos e caracterizados indicando tratar-se, na sua grande maioria, de bactérias gram positivas: uma novidade para cana-de-açúcar. Além da caracterização, a realização do antibiograma revelou que os antibióticos Ciprofloxacino e Ceftazidima apresentam potencial para serem utilizados no controle destas bactérias em futuros protocolos de descontaminação.
- Não houve diferenças significativas para os melhores meios, tanto para indução de brotações quanto para enraizamento, considerando as três variedades de cana-de-açúcar testadas. Este resultado proporciona um procedimento a ser seguido em futuros testes com novas variedades, estabelecendo meios iniciais padrão que poderão ser então modificados de acordo com as necessidades destas variedades.