

Regeneração e Multiplicação *in vitro* de células meristemáticas de cana-de-açúcar

Melo, Bruno de Lima

Resumo

O objetivo principal da presente pesquisa foi regenerar e multiplicar em condições de laboratório mudas de cana-de-açúcar através da aplicação da metodologia de cultivo *in vitro* de meristemas, com intuito de obter clones de mudas saudáveis em larga escala, possibilitando a redução da área cultivada e consequentemente a diminuição dos impactos ambientais.

Palavras-chave: Biotecnologia Vegetal. Explante. Meristema. Meio de Cultura. Biotécnicas.

Abstract

The main objective of this research was to regenerate and multiply sugarcane seedlings under laboratory conditions by applying the meristem *in vitro* cultivation methodology in order to obtain large-scale healthy seedling clones, reducing the area consequently the reduction of environmental impacts.

Keywords: Plant Biotechnology. Explant Meristem. Culture medium. Biotechniques.

Resumen

El objetivo principal de la presente investigación fue regenerar y multiplicar las plántulas de caña de azúcar en condiciones de laboratorio mediante la aplicación de la metodología de cultivo *in vitro* de meristem para obtener clones de plántulas sanas a gran escala, reduciendo el área en consecuencia la reducción de los impactos ambientales.

Palabras clave: Biotecnología vegetal. Explantar Meristemo El medio de cultivo. Biotecnologías.

INTRODUÇÃO

A técnica de propagação *in vitro* por meio de meristema apical é considerada uma alternativa vantajosa para a multiplicação de diversas variedades de plantas, devido à economia de tempo em relação às técnicas convencionais, além da obtenção de mudas de excelente qualidade fitossanitária e geneticamente idênticas ao material de origem (VIEIRA et al., 2009).

Na cana-de-açúcar, diversos estudos têm demonstrado que o tecido mais adequado é o meristema apical oriundo de perfilho jovens, com grande vigor e crescimento, e que sejam removidos de colmos de tamanhos variando entre vinte e oitenta centímetros (PAULA CIDADE et al., 2006). Segundo os autores, as gemas apicais apresentam maior capacidade de crescimento do que gemas axilares que estão sob efeito da dominância apical. Depois de isolados e inoculados em meio de cultura apropriado, os meristemas apicais de cana-de-açúcar se desenvolvem dando origem às plântulas que serão então multiplicadas, enraizadas e aclimatizadas (COSTA LIMA et al., 2001). A retirada de explantes de cana-de-açúcar deve ser feita, de acordo com Lee (1984), de preferência a partir de brotações novas que são formadas durante a fase ativa de crescimento da planta, durante os meses mais quentes do ano (primavera e verão).

Durante a coleta, deve ser mantido o maior nível de assepsia possível, utilizando instrumentos limpos e esterilizados. As partes coletadas são colocadas em sacos plásticos para evitar o dessecamento, devem ser devidamente identificadas e imediatamente levadas ao laboratório (VIEIRA et al., 2009). Conforme ressaltado pelos autores, a assepsia dos explantes é uma das etapas cruciais da micropropagação, pois é responsável pela eliminação superficial de microorganismos epifíticos e endofíticos antes de sua inoculação no meio nutritivo. Deve ser feita em ambiente esterilizado, utilizando-se câmara de fluxo laminar e agentes assépticos, químicos e físicos.

O tamanho do explante utilizado depende essencialmente do objetivo da micropropagação. Caso se pretenda eliminar algum microorganismo sistêmico como vírus, bactéria ou micoplasma, deve-se considerar, evidentemente, que quanto menor o explante isolado, ou quanto mais isolado este tecido estiver das regiões subjacentes vascularizadas, maiores serão as chances de sucesso (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Mesmo considerando microorganismos contaminantes superficiais, o fato de levar menos tecido para condições assépticas por si somente já colabora para a redução da quantidade desses microorganismos. Segundo estes autores, o tamanho do explante também determina suas possibilidades de sobrevivência e capacidade de crescimento. A princípio, se o objetivo for simplesmente o de propagar, é mais adequado iniciar as culturas com ápices ou segmentos caulinares que contêm

gemas axilares, pois frequentemente explantes muito pequenos não conseguem crescer, ou demoram muito antes de fazê-lo.

A dificuldade maior nesta etapa reside em se obter tecido descontaminado sem conduzi-lo à morte após o seu isolamento (LEE, 1984). São determinantes para o sucesso dessa etapa do trabalho, os pré-tratamentos aplicados na planta matriz, principalmente no que se refere ao controle dos microrganismos endógenos.

Várias substâncias com ação germicida são utilizadas para fazer a desinfestação dos explantes. Os mais comuns são o etanol e os compostos à base de cloro, como o hipoclorito de sódio. Considerando a sensibilidade do tecido a ser desinfestado, manipula-se a concentração da solução e tempo de exposição de maneira inversamente proporcional. O etanol geralmente é utilizado a 70% (v/v), pois acima dessa concentração é menos eficiente e pode desidratar rapidamente os tecidos (LEE, 1984). Em relação aos explantes de cana-de-açúcar, o material coletado envolve colmos e folhas e, principalmente se forem provenientes do campo, podem ser mantidos em água corrente por algumas horas para uma lavagem superficial de partículas de poeira e outras fontes de contaminação superficial.

O início da cultura no escuro é indicado para evitar um estresse naqueles explantes que, na planta, não estavam expostos à luz, como meristemas vegetativos de rizomas, bulbos e raiz. Para a grande maioria das espécies, a incubação inicial na luz, com intensidades de 20 a 70 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, é satisfatório. A luz é fornecida por lâmpadas fluorescentes (tipo Luz do Dia[®] ou Gro-Lux[®]) ou, ainda, combinando as duas para fornecer um espectro de luz mais amplo. Diversas revisões sobre este assunto já foram publicadas, tais como: Murashige (1974), Dicosmos e Misawa (1995), Dodds e Roberts (1995), entre outros. O fotoperíodo tende a ser de dias longos (16 horas de luz por oito horas de escuro) para evitar a indução de dormência. Segundo os autores, a maior parte das culturas cresce satisfatoriamente em temperaturas que variam de 20 a 27°C. Algumas espécies são favorecidas com a incubação inicial em temperaturas baixas, o que pode contribuir para quebrar a dormência de gemas.

Sucessivos sub cultivos podem rejuvenescer os tecidos, tornando a cultura reativa e encurtando a fase de estabelecimento, num fenômeno chamado “rejuvenescimento *in vitro*” (BOULAY, 1984; FRANCLÉT et al., 1987). De acordo com os autores, além da duração da exposição dos tecidos no meio de cultura, a diminuição dos intervalos entre os sub cultivos, o sucessivo isolamento e a cultura de ápices caulinares, sobre os quais é possível praticar certo controle, existe uma variabilidade na capacidade e velocidade de rejuvenescimento de acordo com o clone.

O principal objetivo da fase de multiplicação é produzir o maior número de plantas possível, no menor espaço de tempo, alguns aspectos qualitativos importantes devem ser considerados. Não basta conseguir altas taxas de multiplicação em alguns explantes, o importante é obter uma taxa média satisfatória com o mínimo de variação de explante para explante (LEE, 1984). Segundo o autor, outro aspecto essencial é a qualidade e homogeneidade das partes aéreas produzidas, pois estas características vão determinar o sucesso na fase seguinte de enraizamento.

A fase de enraizamento caracteriza-se pela formação de raízes adventícias nas partes aéreas provenientes da multiplicação, permitindo, assim, o posterior transplântio para condições *ex vitro*. Como mencionado anteriormente, a qualidade das partes aéreas provenientes da fase de multiplicação determina, em geral, o sucesso do enraizamento. Partes aéreas pequenas não enraízam bem e necessitam de uma fase intermediária de alongamento (LEE, 1984; PAULA CIDADE et al., 2006).

Para realizar culturas *in vitro* de plantas, quer sejam de células isoladas, órgãos ou calos, deve-se, primeiramente, estabelecer as melhores condições da cultura, sendo fatores relevantes, segundo Dodds e Roberts (1995), o meio de cultura, a temperatura, a agitação, a aeração, o projeto do biorreator (ou o local de cultivo), os fatores de contaminação, a incidência de luz e fotoperíodo, a densidade celular, o uso de meio condicionado, o potencial osmótico e o pH. Deste modo, os autores ressaltam que o sucesso de um sistema de micropropagação depende do controle deste grande número de variáveis. Ao contrário do que se acredita, por exemplo, a composição do meio de cultura não é a variável determinante do sucesso da micropropagação ou o “segredo” de um protocolo comercial. A função dos vários componentes utilizados nos meios de cultura é suficientemente conhecida e a repetição de uma determinada formulação é praticamente absoluta.

Uma vez que cada espécie ou clone apresenta características únicas, determinadas por fatores genéticos, as necessidades para seu cultivo *in vitro* também tendem a ser únicas. A capacidade de regeneração e crescimento *in vitro* parece estar associada não apenas ao genótipo, mas também à atividade fisiológica na planta-matriz, sob o controle de diversos fatores endógenos (SILVA, 2012). O verdadeiro desafio, segundo o autor, está no material vegetal e na sua manipulação antes de excisar o explante inicial, e em todos os passos até o transplântio da planta produzida. Esta manipulação inclui: manejo da planta-matriz, as características do explante utilizado, o procedimento de sub cultivo adotado, as condições ambientais e micro ambientais dentro do frasco de cultura e o transplântio.

Conforme descrito por Dodds e Roberts (1995), todas essas etapas são influenciadas por diversas variáveis imponderáveis, que frequentemente restringem a repetição dos resultados, dificultando a determinação de um protocolo efetivamente comercial de micropropagação.

O meio de cultura pode ser sólido (com partículas sólidas), semissólido (géis) ou líquido, dependendo do tipo de cultivo desejado. A consistência do meio merece atenção com relação às concentrações dos componentes, principalmente dos reguladores de crescimento. Como descrito por Buitelaar e Tramper (1992), a difusão dos componentes é alterada de acordo com a consistência do meio e, conseqüentemente, a disponibilidade dos elementos à célula vegetal.

Diversas formulações de meio de cultura já estão catalogadas como sendo meio basal padrão. O meio mais comumente utilizado para cultura de tecidos vegetais é o desenvolvido por Murashige e Skoog (1962) - meio MS, o qual apresenta como principal característica a sua elevada concentração de nitrato, potássio e amônia. Os meios de cultivo para células vegetais são complexos e apresentam em sua composição:

Macronutrientes: Nitrogênio, Fósforo, Potássio, Cálcio, Magnésio e Enxofre. O Nitrogênio é adicionado em grande quantidade e pode estar presente na forma de nitrato (NO_3^-) ou amônia (NH_4^+), ou em combinação dos dois íons, ou ainda, na forma de aminoácidos. A fonte de Nitrogênio, tanto em termos de quantidade como em qualidade, tem demonstrado afetar o rendimento em biomassa (DICOSMOS e MISAWA, 1995), assim como a relação entre amônia e nitrato também afeta a produção de metabólitos secundários (RAMACHANDRA RAO e RAVISHANKAR, 2002). Os demais sais são adicionados através dos seguintes compostos: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ para Enxofre e Magnésio; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ou KH_2PO_4 , para o Fósforo; KCl e/ou KNO_3 e/ou KH_2PO_4 para Potássio; e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ou $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ para Cálcio (MISAWA, 1994; DODDS e ROBERTS, 1995).

A concentração de fosfatos no meio tem maior influência sobre a fisiologia e o metabolismo de células vegetais em culturas *in vitro* (WEN e ZHONG, 1997) e atua no metabolismo energético, na regulação de processos enzimáticos e na ativação de enzimas (SANTIAGO et al., 2001; GUERRA e NODARI, 2006).

Micronutrientes: são traços de certos elementos minerais que são requeridos por todas as células. Estão incluídos nesta lista o Ferro, o Manganês, o Zinco, o Boro, o Cobre, o Molibdênio e o Cloro (DODDS e ROBERTS, 1995).

As auxinas são substâncias que controlam o crescimento e o alongamento celular e as citocininas estimulam a divisão celular e reduzem a dominância apical (PASQUAL, 2001). Das citocininas comercialmente disponíveis, a 6-benzilaminopurina (BAP), é a que, em geral, apresenta melhores resultados *in vitro* para promover a multiplicação de diversas espécies (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1988).

Segundo Assis e Teixeira (1998) quanto ao enraizamento, às auxinas mais utilizadas são o ácido indolbutírico (AIB) e o ácido naftaleno acético (ANA). Os reguladores de crescimento

podem ser encontrados na forma natural ou sintética, e quando aplicados em plantas influenciam no seu crescimento e no seu desenvolvimento.

Buitelaar e Tramper (1992) citam culturas que apresentam melhor produção de metabólitos em temperaturas em torno de 35°C, contudo, a viabilidade celular decresce rapidamente nessa temperatura. Temperaturas entre 17 e 25°C são normalmente utilizadas para indução de calos e crescimento de células em suspensão. Entretanto, cada espécie pode ser favorecida em diferentes temperaturas (MISAWA, 1994). No caso específico do cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar, a maioria dos autores normalmente utiliza temperatura de 25°C (LEE, 1984; PAULA CIDADE et al, 2006).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados três variedades de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar (CTC 9002; IAC 91-1099 e o IACSP 95-5000), em seguida foram levadas até o Laboratório de Citogenômica e Bioinformática (LCGBI) para a realização dos seguintes procedimentos de micropropagação *in vitro*:

1º Procedimento: coleta do meristema apical das mudas pré-brotadas e análise do desempenho durante o cultivo *in vitro*, utilizando como critério de avaliação a capacidade de cada genótipo em produzir culturas celulares com elevada taxa de crescimento de calos e posterior regeneração de plântulas.

As mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar estavam em estágio inicial de crescimento, representadas por colmos jovens, com 15 a 20 centímetros de comprimento. Cada variedade foi representada por 20 colmos jovens, os quais foram lavados em água corrente dentro do laboratório, para a remoção de quaisquer resíduos de substrato ou contaminações na superfície das folhas. O processo de desinfestação foi realizado em capelas de fluxo laminar em condições assépticas, utilizando vidraria previamente esterilizada, foram retiradas todas as folhas das mudas pré-brotadas e após sobrar somente o ponteiro denominado “palmito”, foram lavados em álcool 70% durante 30 segundos, por três vezes sem reutilização das soluções, mantendo-se os ápices dos colmos (com aproximadamente 10 cm cada um) imersos em água destilada estéril e mantidos dentro da câmara de fluxo laminar durante todos os procedimentos de remoção e inoculação dos meristemas apicais (Figura 1).

Figura 1: Vidrarias e utensílios previamente esterilizados e palmitos das mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar imersos em água destilada, prontos para a remoção dos meristemas apicais



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os palmitos já limpos e submersos em água destilada dentro da câmara de fluxo laminar, recebeu cortes longitudinais com bisturi esterilizado, obtendo explantes em formato de disco, que imediatamente após cortados, foram mergulhados em placa de Petri com ácido cítrico a 150 mg/L^{-1} para evitar oxidação no tecido vegetal. Foi necessário manuseá-los adequadamente para não ocorrer contato dos discos com as pontas do palmito, que sem o devido cuidado pode acarretar em contaminações. Feito isso, os discos foram retirados do ácido cítrico e colocados em papel de filtro para retirada do excesso de solução (Figura 2).

Figura 2: Retirada do excesso de solução de ácido cítrico em papel de filtro dos discos meristemáticos



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a retirada do excesso de solução de ácido cítrico dos discos meristemáticos, os mesmos foram transferidos e inoculados para frascos de vidro autoclavados e esterilizados contendo 30 ml da solução salina do meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), (Tabela 1).

Tabela 1: Composição do meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962)

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO (mg L ⁻¹)
Macronutrientes	
Nitrato de Amônio - NH ₄ NO ₃	1.650,0
Nitrato de Potássio - KNO ₃	1.900,0
Cloreto de Cálcio - CaCl ₂ .2H ₂ O	441,0
Sulfato de Magnésio - MgSO ₄ .7H ₂ O	370,0
Fosfato de Potássio - KH ₂ PO ₄	170,0
Sódio EDTA - Na ₂ EDTA	37,25
Iodeto de Potássio - KI	0.83
Micronutrientes	
Sulfeto de Ferro - FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85
Sulfato de Manganês - MnSO ₄ .H ₂ O	16,9
Sulfato de Zinco - ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
Ácido Bórico - H ₃ BO ₃	6.2
Molibdato de Sódio - Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
Cloreto de Cobalto - CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
Sulfato de Cobre - CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
Vitaminas	
Ácido Nicotínico - C ₆ H ₅ NO ₂	0,92
Cloridrato de Piridoxina - C ₆ H ₁₂ ClNO ₂	3,84
Cloridrato de Tiamina - C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ OS	5,06
Glicina - C ₂ H ₅ NO ₂	0,75
Ácido Ascórbico - C ₆ H ₈ O ₆	1,76
Glutamina - C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	1,46
Ácido Aspártico - C ₄ H ₇ NO ₄	1,33
Prolina - C ₅ H ₉ NO ₂	1,15
Arginina - C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	1,74
Inositol - C ₆ H ₁₂ O ₆	100,0
Outros	
Agar	19.000,0

Fonte: EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2011).

O meio de cultura foi solidificado com Agar (9g/L), e teve o seu potencial hidrogeniônio ajustado previamente à adição de Agar, para o valor de pH 6,3, para que resultasse em pH 5.8 após a autoclavagem a uma atmosfera por 20 minutos. O meio foi preparado com dez dias de antecedência e armazenado em sala climatizada com temperatura de 25°C, protegidos da luz.

Os discos foram mantidos para a indução de calogênese por 15 dias sem a presença de luz, onde recebeu quatro meristemas do mesmo genótipo em sua superfície (Figura 3).

Figura 3: Inoculação dos discos meristemáticos em meio de cultura MS para início da indução dos calos



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após quinze dias em que os discos meristemáticos ficaram inoculados em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e mantidos no escuro, os mesmos foram transferidos para novos frascos contendo o mesmo meio de cultura MS com acréscimo de dois hormônios vegetais (Tabela 2), responsáveis pela regeneração das plântulas e mantidos no escuro por mais 15 dias.

Tabela 2: Dosagem dos hormônios vegetais utilizados no meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), para regeneração das plântulas

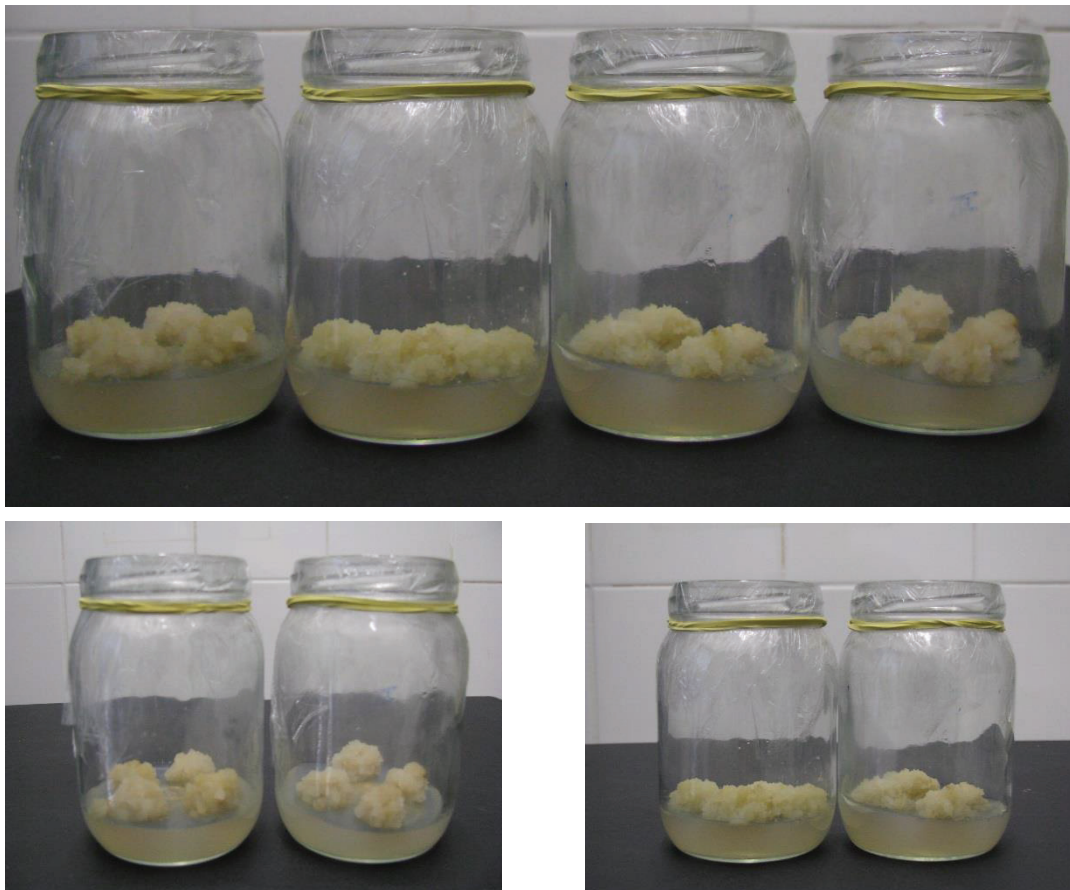
COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO (mg L ⁻¹)
Hormônios Vegetais	
BAP (6-benzil aminopurina)	0,45
ANA (ácido naftalenoacético)	3,72

Fonte: Elaborado pelo autor.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os discos meristemáticos foram mantidos no escuro por 15 dias, a uma temperatura de aproximadamente 25°C, após esse período, houve o crescimento e multiplicação de calos embriogênicos (Figura 4).

Figura 4: Multiplicação de células de cana-de-açúcar a partir da inoculação de meristemas apicais



Fonte: Elaborado pelo autor.

Em seguida foram individualizados cada calo em um frasco diferente, para a manutenção dos mesmos, posteriormente a esse período os discos foram passados para frascos de vidro contendo meio de cultura para regeneração de plântulas, na presença de luz por 16 horas/dia e temperatura de 27°C ± 1°C, sendo 20 frascos de cada cultivar avaliado, contendo uma cultura celular em cada. Após 30 dias, as culturas celulares foram passadas para meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e continuaram na presença de luz. Após dez dias, haviam plântulas regeneradas (Figura 5 e 6).

Figura 5: Multiplicação *in vitro* de plântulas a partir de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 6: Plântula de cana-de-açúcar regenerada *in vitro*



Fonte: Elaborado pelo autor.

O acompanhamento foi feito diariamente, observando as regenerações, desenvolvimento e contaminação das plântulas. Quando ocorria contaminação, seja por bactéria ou fungo, eram salvos os discos ou plântulas que não estavam em contato com o microorganismo, passando-os que estavam livres de contaminação para outro vidro e os que estavam em contato com a contaminação foram descartados.

O cultivo *in vitro* dos discos meristemáticos obtidos a partir das mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar, foi notado que a primeira mudança ocorreu na presença de luz, que foi a alteração na coloração das culturas celulares, passando de creme para esverdeado. Após transferência das células para a luz, as mesmas iniciaram o processo de diferenciação, onde algumas estruturas do vegetal são formadas, como folhas, por exemplo. Ocorreu a formação de estruturas de coloração roxa que posteriormente deram origem às raízes (Figura 7).

Figura 7: Desenvolvimento do sistema de produção rápida de plântulas *in vitro* de cana-de-açúcar



Fonte: Elaborado pelo autor.

O estado regenerativo das plântulas obtidas foi avaliado como bom já que as mesmas apresentaram folhas, caules e raízes formados. Seria regular, se apresentassem apenas folhas e caules, e ruim, se estivessem em início de regeneração e sem presença de estruturas bem definidas.

CONCLUSÃO

A metodologia de cultivo *in vitro* de meristemas apicais, apresentou resultados fantásticos, portanto a utilização desta tecnologia pode ser preconizada em produção de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar em larga escala.

AGRADECIMENTOS

À CAPES pela bolsa de auxílio.

REFERÊNCIAS

- 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-CNPq, v. 1, p. 261-296, 1998.
- BOULAY, M. Aspects pratiques de la multiplication in vitro des essences forestiers. *Annales de Recherches Sylvicoles AFOCEL*, v.21: p.61-78, 1984.
- BUITELAAR, R. M. e TRAMPER, J. Strategies to improve the production of secondary metabolites with plant cell cultures: a literature review. *Journal of Biotechnology*, v. 23: p. 111-141, 1992.
- COSTA LIMA, M. A.; GARCIA, R. O.; MARTINS, G. S.; MANSUR, E. Morfogênese in vitro e susceptibilidade de calos de variedades nacionais de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) a agentes seletivos utilizados em sistemas de transformação genética. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 73-77, mar. 2001.
- DICOSMOS, F. e MISAWA, M. Plant cell and tissue culture: alternative for metabolite production, In: *Biotechnology Advances*. Pergamon: Grã Bretanha, v. 13: p. 425-453, 1995.
- DODDS, J. H. e ROBERTS, L. W. *Experiments in Plant Tissue Culture*. 3. ed. Cambridge University Press: England, 256p, 1995.
- FRANCLÉ, A.; BOULAY, M.; BEKKAOUI, M.; FOURET, Y.; VERSCHOORE-MARTOUZET, B.; WALKER, N. Rejuvenation. In: BONGA, J. M.; DURZAN, J.; ed. *Cell and tissue culture in forestry: general principles and biotechnology*. Dordrecht: MartinusNijhoff, 1987.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, A. J. (Eds.). Cultura de tecidos e transformação de plantas. Brasília: Embrapa – SPI / CNPq, 1998.-v.1, p.183-260.
- GUERRA, M. P. e NODARI, R. O. *Apostila de Biotecnologia 1 – Cultura de tecidos vegetal*. CCA/UFSC, Florianópolis. Edição da Steinmacher, 2006.
- LEE, T. S. G.; BACCHI, O. O. S. Improved rooting of differentiated shoots from sugarcane callus tissue, *Turrialba*, v. 34, n.4, p. 481-484, 1984.
- MISAWA, M. *Plant tissue culture: an alternative for production of useful metabolite*, 1994. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/t0831e/t0831e00.html>. Acesso em: 10 out. 2015.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. *Annual Review of Plant Physiology*, v. 25: p. 135-166, 1974.
- MURASHIGE, T. e SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, v. 15, n. 3: p. 472-497, 1962.
- PASQUAL, M. *Textos acadêmicos: meios de cultura*. Lavras: FAEPE/UFLA, p. 127, 2001.
- PAULA CIDADE, D. A.; GARCIA, R. O.; DUARTE, A. C.; SACHETTO-MARTINS, G.; MANSUR, E. Morfogênese in vitro de variedades brasileiras de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 41, n. 3, p. 385-391, mar. 2006.

Melo, B. L.;

Regeneração e Multiplicação in vitro de células meristemáticas de cana-de-açúcar

RAMACHANDRA RAO, S e RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, v. 20: p. 101-153, 2002.

SANTIAGO, E. J. A.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; SANTANA, J. R. F.; GOMES, G. A. C. Multiplicação: Cultura de tecidos. In: *Paiva e Paiva*, UFLA, Lavras, M.G. 5: p. 50-57, 2001.

SILVA, M. I. *Embriogênese somática indireta de duas variedades RB de cana-de-açúcar*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Alagoas. Rio Largo – AL, 86p, 2012.

VIEIRA, R. A.; SILVA, C. M.; SOUTO, E. R.; HATA, F. T.; SILVA MACHADO, M. F. P.; MARCUZ, F.S. Diferentes concentrações de 6- benzilaminopurina e cinetina na micropropagação *in vitro* das variedades RB867515 e RB855156 de cana-de-açúcar. *Campo Digital*, Campo Mourão, v. 4, n. 1, p. 122-126, jan/dez. 2009.

WEN, Z. Y.; ZHONG, J. J. Effect of initial phosphate concentration on physiological aspects of suspension cultures of rice cells: a kinetic study. *Journal of Fermentation and Technology*, v. 83: p. 381-385, 1997.

1 MELO, Bruno de Lima. Biólogo; Especialista em Avaliação do Ensino e da Aprendizagem; Especialista em Tutoria em Ensino a Distância (EAD) e Mestre em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional, todos pela Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE). Possui experiência nas áreas de Genética e Biotecnologia Vegetal, Agroecologia, Sustentabilidade na Produção de Alimentos (Agricultura Sustentável e Segurança Alimentar), Meio Ambiente, Microbiologia e Higiene de Alimentos, Ecogastronomia e Docência no Ensino Superior. Atuando principalmente nos seguintes temas: Técnicas de cultivo in vitro e manipulação de células e tecidos vegetais; Manutenção de cultivos celulares in vitro de cultivares de cana-de-açúcar; Avaliação de novas composições de meio de cultura contendo substâncias antioxidantes e Biotécnicas aplicadas ao aumento da produção vegetal através do sistema denominado de Mudas Pré-Brotadas bruno_melo_blm@hotmail.com