

REDUÇÃO DO IMPACTO AMBIENTAL COM GÉIS HIDRORRETENTORES E
CULTIVO DE MERISTEMAS, EM MUDAS DE CANA-DE-AÇÚCAR

BRUNO DE LIMA MELO

**REDUÇÃO DO IMPACTO AMBIENTAL COM GÉIS HIDRORRETENTORES E
CULTIVO DE MERISTEMAS, EM MUDAS DE CANA-DE-AÇÚCAR**

BRUNO DE LIMA MELO

Dissertação de Mestrado apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional - Área de concentração: Ciências Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Tadeu Alcides Marques

363.7
M528r

Melo, Bruno de Lima.

Redução do impacto ambiental com géis hidrorretentores e cultivo de meristemas, em mudas de cana-de-açúcar / Bruno de Lima Melo. – Presidente Prudente, 2017.

(80)f.: il.

Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2017.

Bibliografia.

Orientador: Tadeu Alcides Marques

1. Biofábrica. 2. Agroecologia. 3. Sustentabilidade. 4. Agricultura Familiar. I. Título.

BRUNO DE LIMA MELO

**REDUÇÃO DO IMPACTO AMBIENTAL COM GÉIS HIDRORRETENTORES E
CULTIVO DE MERISTEMAS, EM MUDAS DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação de Mestrado apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional - Área de Concentração: Ciências Ambientais.

Presidente Prudente, 25 de Abril de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Tadeu Alcides Marques
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof. Dr. Oscar de Andrade Junior
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Profª. Dra. Camila Pires Cremasco Gabriel
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP
Tupã-SP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao mestre da vida.

Ao mestre do amor e da sabedoria.

Aquele cujo falar é muitíssimo suave, doce e agradável para mim.

Ao meu amado Jesus Cristo.

Dedico aos meus pais:

Luiz Joaquim de Melo e Maria Lourdes de Lima Melo

Que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões profissionais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela proteção e por me fortalecer diariamente para que eu pudesse concretizar a realização do meu sonho; Agradeço a minha família, por todo o apoio recebido e por sempre acreditarem em mim.

Agradeço ao meu orientador, professor Dr. Tadeu Alcides Marques que confiou em mim o desenvolvimento desta pesquisa e que me deu todo suporte para desenvolvê-la da melhor forma, e que para mim se tornou um grande amigo.

Agradeço a Usina Zilor Energia e Alimentos pela doação do material biológico para a realização desse estudo, em especial ao Sr. Adilson de Souza Costa, líder de produção agrícola, que sempre me recebeu de maneira muito cordial, mantendo-se disposto em me atender sempre que eu precisasse.

Agradeço a CAPES pela taxa concedida para a realização do mestrado;

Agradeço a Universidade do Oeste Paulista (Unoeste);

Ao Laboratório de Citogenômica e Bioinformática (LCGBI);

*Ao Centro de Estudos Avançados em Bioenergia e Tecnologia
Sucroalcooleira (CENTEC).*

Por todo o suporte, infra-estrutura, material e equipamentos disponíveis para que eu pudesse utilizar sempre que fosse necessário e poder concluir com êxito a realização dessa pesquisa.

Agradeço!

*“Sem sonhos, a vida não tem brilho.
Sem metas, os sonhos não têm alicerces.
“Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais”.*
(Augusto Cury)

RESUMO

REDUÇÃO DO IMPACTO AMBIENTAL COM GÉIS HIDRORRETENTORES E CULTIVO DE MERISTEMAS, EM MUDAS DE CANA-DE-AÇÚCAR

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e de açúcar, também sendo o maior produtor de etanol oriundo da cana-de-açúcar. A utilização de mudas pré-brotadas para a instalação do cultivo de cana-de-açúcar apresenta inúmeras vantagens em relação ao método tradicional, pois possibilita o aumento do número de perfilhos e a uniformidade nas linhas de plantio, minimiza as falhas verificadas no sistema convencional, diminui a massa de mudas e o volume de carga a serem transportadas ao campo, melhora a qualidade fitossanitária das mudas e, principalmente, favorece o aumento na produção de energia limpa, devido ao aumento de produtividade e diminuição no consumo de combustível fóssil para as operações de preparo, plantio, colheita e transporte, pelo aumento da produtividade agrícola. Reduz o impacto ambiental causado pela cultura por proporcionar a redução da área cultivada. Outra tecnologia de interesse ambiental é a utilização de polímeros hidrorretentores, pois tem contribuído muito para aumentar a capacidade de retenção de água no solo, reduzindo a frequência de irrigação, quando for o caso, e permitindo a utilização mais efetiva dos recursos do solo e da água, contribuindo para melhorar produtividade agrícola da cultura, promovendo reduções nas áreas, consumo de insumos agrícolas (agrotóxicos) e também trazendo enormes vantagens ambientais e agrícolas. O objetivo principal da presente pesquisa foi produzir, em condições de estufa, mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar, livre de pragas e patógenos agrícolas, sem que haja a utilização de qualquer tipo de agroquímico, com o emprego de diferentes doses de polímeros hidrorretentores, e posteriormente, aplicação da metodologia de cultivo *in vitro* de meristemas, com intuito de obter clones de mudas sadias em larga escala, possibilitando a redução da área cultivada e conseqüentemente a diminuição dos impactos ambientais. A cultura canavieira é conhecida como uma grande cultura, pois apenas com escala de plantio é que se consegue retorno financeiro, portanto as unidades industriais ocupam grandes áreas de monocultura. Novos cultivares com características genéticas para aumentar a produtividade e o teor de açúcar, resistência a pragas e doenças pode proporcionar uma significativa redução nas plantadas, desde que consigam ser implantadas rapidamente e com viabilidade técnica. Associações de pequenos produtores podem viabilizar biofábricas, as quais poderão produzir mudas pré-brotadas com intuito de agilizar a substituição de cultivares antigas, proporcionando a melhoria social e cultural. Pelos parâmetros biométricos e fisiológicos analisados, tem-se grande potencial na utilização de polímero hidrorretentores para crescimento mais rápido com economia de água. O cultivo *in vitro*, apresentou resultados fantásticos, portanto a utilização pode ser preconizada, em produção de MPB. Existe uma relação entre a carga genética (cultivar) nas variáveis biométricas e fisiológicas, no crescimento das mudas de MPB. Novos experimentos, que acompanhem até a colheita do material produzido devem ser realizados para aferir se ocorrem aumentos de produtividades, os quais poderiam levar as reduções de áreas de cultivos e conseqüentemente redução de impactos ambientais. A criação de biofábricas por pequenos produtores ou assentados é totalmente possível, demandando políticas públicas e sensibilização de empresários do setor, através de incentivos fiscais e legislações específicas.

Palavras-chave: Biofábrica. Agroecologia. Sustentabilidade. Agricultura Familiar.

ABSTRACT

REDUCTION OF THE ENVIRONMENTAL IMPACT WITH GIS HYDRORETHETERS AND CULTIVATION OF MERYSTONES, IN CHIPS OF SUGAR CANE

The Brazil is the world's largest producer of sugar cane and sugar, also the largest producer of ethanol from sugarcane. The use of pre-budded seedlings for the installation of sugarcane cultivation presents numerous advantages over the traditional method, since it allows the increase of the number of tillers and the uniformity in the planting lines, minimizes the flaws verified in the conventional system, Reduces the mass of seedlings and the volume of cargo to be transported to the field, improves the phytosanitary quality of the seedlings and, mainly, favors the increase in the production of clean energy, due to the increase of productivity and decrease in the consumption of fossil fuel for the Planting, harvesting and transport operations, by increasing agricultural productivity. It reduces the environmental impact caused by the crop by providing reduced cultivated area. Another technology of environmental interest is the use of water-repellent polymers, since it has contributed greatly to increase the water retention capacity in the soil, reducing the frequency of irrigation, when applicable, and allowing more effective use of soil and water resources. Water, contributing to improve agricultural productivity of the crop, promoting reductions in the areas, consumption of agricultural inputs (agrochemicals) and also bringing enormous environmental and agricultural advantages. The main objective of this research was to produce, in greenhouse conditions, pre-sprouted sugarcane seedlings, free of pests and agricultural pathogens, without the use of any type of agrochemical, using different doses of Hydrotherapeutic polymers, and later application of in vitro culture method of meristems, in order to obtain clones of healthy seedlings in a large scale, allowing the reduction of cultivated area and consequently the reduction of environmental impacts. The sugar cane culture is known as a great culture, because only with planting scale does it obtain financial return, so the industrial units occupy large areas of monoculture. New cultivars with genetic traits to increase productivity and sugar content, resistance to pests and diseases can provide a significant reduction in plantings, provided they can be deployed quickly and with technical feasibility. Smallholder associations can make biofactories viable, which can produce pre-sprout seedlings in order to speed up the replacement of old cultivars, providing social and cultural improvement. Due to the biometric and physiological parameters analyzed, there is great potential in the use of water-repellent polymer for faster growth with water saving. The in vitro culture presented fantastic results, so the use can be recommended in MPB production. There is a relation between the genetic load (cultivar) in biometric and physiological variables, in the growth of MPB seedlings. New experiments that accompany the harvesting of the material produced must be carried out to determine if there are increases in productivity, which could lead to reductions in crop areas and consequently reduction of environmental impacts. The creation of biofábricas by small producers or settlers is totally possible, demanding public policies and

sensitization of entrepreneurs of the sector, through fiscal incentives and specific legislations.

Keywords: Biofactory. Agroecology. Sustainability. Family Farming.

LISTA DE SIGLAS

CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CENTEC	Centro de Estudos Avançados em Bioenergia e Tecnologia Sucroalcooleira
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DAP	Dias Após o Plantio
DAT	Dias Após os Tratamentos
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
LCGBI	Laboratório de Citogenômica e Bioinformática
MPB	Muda Pré-Brotada

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Etapas do crescimento evolutivo das mudas pré-brotadas.....	23
FIGURA 2 -	Colmos de cana-de-açúcar lavados e prontos para o corte.....	45
FIGURA 3 -	Guilhotina semi-automática de lâmina dupla para cortar os minirrebolos.....	45
FIGURA 4 -	(a) Corte dos colmos de cana; (b) Obtenção dos minirrebolos.....	46
FIGURA 5 -	(a) Separação dos cultivares em sacos; (b) Tratamento térmico.....	46
FIGURA 6 -	(a) Instalação dos minirrebolos na mesa; (b) Irrigação manual.....	48
FIGURA 7 -	Emergência e pré-brotação das plântulas de cana-de-açúcar.....	48
FIGURA 8 -	(a) Individualização das mudas; (b) Processo de repicagem.....	49
FIGURA 9 -	(a) Polímero in natura; (b) Polímero hidratado.....	49
FIGURA 10 -	(a) Casa de Vegetação; (b) Mudas pré-brotadas sendo aclimatadas.....	50
FIGURA 11 -	(a) Mudas com excelente vigor; (b) Bancada a pleno sol com as mudas.....	51
FIGURA 12 -	Mudas adaptadas à sombra para análise de fluorescência.....	52
FIGURA 13 -	Vidrarias esterilizadas e ponteiros das (MPB) imersos em água destilada, prontos para a remoção dos meristemas.....	54
FIGURA 14 -	Vista do processo de corte dos discos meristemáticos e retirada do excesso de solução de ácido cítrico em papel de filtro.....	54
FIGURA 15 -	Discos meristemáticos logo após a inoculação em meio de cultura para a formação de culturas celulares.....	55

FIGURA 16 - Culturas celulares exibindo pronunciado crescimento e uma estrutura friável.....	55
FIGURA 17 - Multiplicação <i>in vitro</i> de plântulas cana-de-açúcar a partir de mudas pré-brotadas (MPB).....	56
FIGURA 18 - Desenvolvimento de sistema de produção rápida de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar, a partir de MPB.....	70

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Resultado de Análise de Tecido Vegetal (Macro e Micronutrientes) do substrato Carolina Padrão [®] , utilizado na realização do experimento.....	47
TABELA 2 -	Composição do meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962).....	58
TABELA 3 -	Análise de Variância para as variáveis estudada (F), sendo: (NS) = Não Significativo a 5%; (*) = Significativo a 5% e (**) = Significativo a 1%.....	59
TABELA 4 -	Resultados estatísticos para variável Diâmetro do Colmo (mm), nos cultivares e tratamentos utilizados.....	60
TABELA 5 -	Resultados estatísticos para variável Altura das Mudanças (cm), nos cultivares e tratamentos utilizados.....	61
TABELA 6 -	Resultados estatísticos para variável Massa Fresca da Parte Aérea (g), nos cultivares e tratamentos utilizados.....	62
TABELA 7 -	Resultados estatísticos para variável Massa Seca da Parte Aérea (g), nos cultivares e tratamentos utilizados.....	63
TABELA 8 -	Resultados estatísticos para variável Eficiência Quântica do Fotossistema II (F_v/F_m) aos 30 dias após os tratamentos (DAT), nos cultivares e tratamentos utilizados.....	64
TABELA 9 -	Resultados estatísticos para variável Eficiência Quântica do Fotossistema II (F_v/F_m) aos 45 dias após os tratamentos (DAT), nos cultivares e tratamentos utilizados.....	65
TABELA 10 -	Resultados estatísticos para variável Eficiência Quântica do Fotossistema II (F_v/F_m) aos 60 dias após os tratamentos (DAT), nos cultivares e tratamentos utilizados.....	66
TABELA 11 -	Resultados estatísticos para variável Índice de Clorofila aos 30 dias após os tratamentos (DAT), nos cultivares e tratamentos utilizados...	67
TABELA 12 -	Resultados estatísticos para variável Índice de Clorofila aos 45 dias após os tratamentos (DAT), nos cultivares e tratamentos utilizados...	68
TABELA 13 -	Resultados estatísticos para variável Índice de Clorofila aos 60 dias após os tratamentos (DAT), nos cultivares e tratamentos utilizados...	69

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	JUSTIFICATIVAS.....	17
3	OBJETIVOS	18
3.1	Objetivo Geral.....	18
3.2	Objetivos Específicos.....	18
4	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
4.1	Sistema de Multiplicação por Mudas Pré-Brotadas (MPB)	19
4.2	Aspectos gerais da cana-de-açúcar.....	21
4.2.1	Fases morfológicas.....	23
4.2.2	Sistema radicular.....	25
4.3	Polímero Hidrorretentor	26
4.4	Biofábrica de Mudas.....	28
4.5	Metodologia de Micropropagação.....	29
4.5.1	Iniciação e estabelecimento da cultura	30
4.5.2	Desinfestação	32
4.5.3	Incubação	33
4.5.4	Fase de multiplicação	33
4.5.5	Fase de enraizamento	34
4.5.6	Fatores do ambiente que influenciam o cultivo <i>in vitro</i>	34
4.5.7	Composição do meio de cultura	35
4.5.8	Hormônios	37
4.5.9	Temperatura	38
4.6	Uso da biotecnologia para uma agricultura sustentável.....	38
4.7	Medição do teor de clorofila via índice SPAD	40
4.7.1	Pigmentos fotossintéticos: clorofila a e b	41
4.7.2	Pigmentos fotossintéticos e Eficiência fotoquímica do fotossistema II	42
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	44
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
7	CONCLUSÕES.	71
	REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, tendo grande importância para o agronegócio brasileiro. O aumento da demanda mundial por etanol oriundo de fontes renováveis, aliado às grandes áreas cultiváveis e condições edafoclimáticas favoráveis à cana-de-açúcar, tornam o Brasil um país promissor para o cultivo e exportação dessa cultura (CONAB, 2016).

A cana-de-açúcar além de ser uma fonte de energia renovável é considerada uma das grandes alternativas para o setor de biocombustíveis, devido ao seu grande potencial na produção de etanol. A vantagem do uso de biocombustíveis é a redução significativa da emissão de gases poluentes.

Atualmente a conscientização da população em relação ao meio ambiente tem aumentado, devido aos efeitos indesejáveis que a utilização de combustíveis fósseis causa na atmosfera da Terra e aos efeitos desastrosos do aquecimento da superfície do planeta (CONAB, 2016).

A propagação convencional desta espécie é realizada a partir de segmentos de colmos provenientes de plantas do campo, após o primeiro ou segundo ano de plantio. Porém, novos cultivares estão continuamente sendo desenvolvidos e sua disponibilização pode ser acelerada por meio de técnicas como muda pré-brotada (MPB) e por meio da biotecnologia vegetal, via micropropagação.

O sistema de multiplicação de cana-de-açúcar que pode contribuir para a produção rápida de mudas, associado a um elevado padrão de fitossanidade, vigor, uniformidade nas linhas de plantio, diminuição da área cultivada e redução do impacto ambiental, é o que utilizam mudas pré-brotadas (MPB).

Em relação às pragas e patógenos agrícolas que afetam a cultura, o aspecto da qualidade da muda tem grande relevância, no sistema MPB o efeito destas pragas e doenças é minimizado pelo fato de ocorrer seleção das gemas que originarão as mudas no viveiro, pois se elimina praticamente qualquer risco na disseminação, constituindo-se uma das principais vantagens do sistema MPB (INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS, 2012).

A obtenção de mudas de cana-de-açúcar com características adaptadas para cada região de cultivo é um elemento fundamental para a qualidade da produção de açúcar, álcool e outros subprodutos desta planta, bem como

assegurar a adaptação da espécie nos diferentes locais onde ela está sendo introduzida (MATSUOKA; GARCIA; ARIZONO, 2005).

Os polímeros hidrorretentores são muito utilizados na produção de mudas de diversas espécies. Esse polímero é um produto sintético a base de poliacrilamida que possui uma grande capacidade de retenção e armazenamento de água (AZEVEDO, 2000; AZEVEDO; BERTONHA; GONÇALVES, 2002) quando incorporado ao solo aumenta a disponibilidade de água e nutrientes às plantas, atuando como condicionadores de solo (AZEVEDO, 2000; CORTÉS et al., 2007; CAMARA et al., 2011; BERNARDI et al., 2012).

Artigos científicos relatam o efeito benéfico da utilização desse produto quando incorporado ao substrato para a produção de mudas de algumas espécies, como o café (*Coffea arabica* L.) (LIMA et al., 2003; MELO et al., 2005; MARQUES; CRIPA; MARTINEZ, 2013), a amoreira (*Morus* sp) (MOREIRA et al., 2011) e o eucalipto (*Corymbia citriodora*) (BERNARDI et al., 2012).

O Brasil lança na atmosfera cerca de 250 milhões de toneladas de carbono a cada ano, o que correspondem a quase 4% das emissões mundiais, classificando-o como o terceiro maior emissor de gases do efeito estufa.

A cana de açúcar é a matéria prima responsável para a produção de energia, o bagaço da cana possibilita a produção de energia limpa e muitas unidades industriais já desenvolvem essa atividade, obtendo certificação de emissões de créditos de carbono pelo Mecanismo de Desenvolvimento Limpo (MDL), criado pelo Protocolo de Kyoto para auxiliar o processo de redução de emissões de Gases do Efeito Estufa (GEE).

Outro ponto importante é que o etanol hidratado, que move no país uma considerável frota de veículos, tem contribuído para a melhoria do meio ambiente, principalmente nas regiões metropolitanas por se tratar de um combustível limpo, o álcool tornou-se um grande aliado na luta contra a poluição ambiental.

2 JUSTIFICATIVAS

A presente pesquisa apresenta uma grande importância em colaborar com a redução dos níveis de herbicidas, inseticidas e fungicidas que seriam lançados na plantação convencional de cana-de-açúcar, para controle e combate aos agentes patológicos e pragas agrícolas que atingem a planta e que, conseqüentemente contaminam o solo, a água e o ar.

Os impactos ambientais proporcionados pelo cultivo tradicional da cana-de-açúcar poderão ser reduzidos através das metodologias propostas, que serão de suma importância para o meio ambiente e ao desenvolvimento regional do Oeste Paulista, pois permitirá a diminuição das áreas plantadas, através de viveiro de mudas, redução dos problemas causados pelos agentes químicos e possibilidade da melhoria na qualidade de vida dos pequenos produtores através de práticas agroecológicas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O principal objetivo desse estudo foi à produção de mudas de cana-de-açúcar, utilizando à técnica de Mudas Pré-Brotadas (MPB) com o emprego de diferentes doses de polímeros hidrorretentores, e posteriormente aplicação da metodologia de cultivo *in vitro* de meristemas, com intuito de obter plântulas saudáveis em larga escala, possibilitando a redução da área cultivada e conseqüentemente a diminuição dos impactos ambientais.

3.2 Objetivos Específicos

Propondo a possibilidade da diminuição da área de cultivo com cana-de-açúcar, permitindo a diminuição dos impactos ambientais através da recuperação do ambiente natural;

Apresentar a importância da instalação de biofábrica aos pequenos produtores, com o propósito de agregar a agricultura familiar e promover o desenvolvimento regional;

Desenvolver técnicas de produção rápida de mudas, associando elevado padrão de fitossanidade, vigor e uniformidade nas linhas de plantio, utilizando o sistema agroecológico.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Sistema de Multiplicação por Mudanças Pré-Brotadas (MPB)

As mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar é uma tecnologia agrícola desenvolvida pelo Programa Cana do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), com o propósito de aumentar a eficiência e os ganhos econômicos na implantação de viveiros, replantio de áreas comerciais, renovação e expansão de áreas com cana-de-açúcar.

Esse sistema vem contribuindo para uma produção rápida de mudas, associado a um elevado padrão de fitossanidade, vigor e uniformidade nas linhas de plantio, redução do número de falhas, redução do volume de mudas comparado com o plantio convencional, diminuição do risco de difusão de pragas e doenças agrícolas (LANDELL et al., 2014).

No plantio de mudas pré-brotadas o volume necessário para se plantar um hectare é muito pequeno, em torno de uma a uma tonelada e meia por hectare. O sistema de mudas pré-brotadas além de reduzir o volume de mudas, permite um melhor controle na qualidade e vigor, redundando em canaviais de excelente padrão clonal e mais homogêneo. Também, a forma de distribuição espacial das mudas na área de produção induz ao melhor aproveitamento dos recursos hídricos e nutricionais, o que reduz a competição intra-específica estabelecida em canaviais com excesso de mudas, situação bastante comum em áreas comerciais de plantio mecanizado (LANDELL et al., 2014).

No plantio convencional realizado por propagação vegetativa, a origem das plantas é realizada através da brotação das gemas. A gema é como se fosse um colmo em miniatura em estado latente. Havendo condições favoráveis, a gema se torna ativa e ocorre o crescimento e desenvolvimento devido à presença de reservas nutricionais, ativação de enzimas e reguladores de crescimento (DILLEWINJ, 1952).

Ou seja, pode ser que a gema brote e desenvolva-se uma planta, e pode ser que a gema não brote caso não encontre condições favoráveis, acarretando em falhas no canavial.

No sistema de mudas pré-brotadas, esta sendo inserida no campo uma planta já desenvolvida, diminuindo o risco de falhas e aumentando homogeneidade do plantio. De acordo com Landell et al., (2014) as gemas que serão usadas para a

formação das mudas pré-brotadas devem seguir os mesmos procedimentos fitossanitários que os viveiros tradicionais, ou seja, serem provenientes de viveiros isentos de doenças, com colmos de idade entre seis a dez meses, oriundos de tratamento térmico e acompanhado de procedimentos de amostras para diagnóstico de doenças.

Após a colheita, é feito a individualização das gemas em minirrebolos, sendo que nesta etapa são descartados os minirrebolos que apresentarem danos nas gemas. Os minirrebolos selecionados são acondicionados em recipientes com substratos, sendo esta etapa visa eliminar os minirrebolos que não brotaram. Após a brotação, os minirrebolos passam por um tratamento térmico visando à prevenção de bactérias e fungos, sendo posteriormente plantados em tubetes de plástico.

Uma vez nos tubetes, as mudas passam por etapas de aclimação e rustificação. Após um período que pode variar de acordo com o manejo adotado de 50 (cinquenta) a 90 (noventa) dias as mudas pré-brotadas já estão aptas a irem para o campo.

Outra vantagem significativa do plantio de mudas pré-brotadas é a redução dos riscos de disseminação de pragas, fator que deve ser cuidadosamente considerado na cultura da cana-de-açúcar, visto que a cultura permanece em campo por cinco ou mais anos após o plantio. No sistema MPB, o efeito destas pragas é minimizado com a seleção das gemas que originarão as mudas no viveiro (LANDELL et al., 2014).

O Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) classifica a produção de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar em sete etapas, conforme descritas a seguir:

1ª Etapa: Corte do minirrebolo, que consiste em fragmentar a cana no nó, nos quais estão as gemas;

2ª Etapa: Tratamento dos minirrebolos, após o corte, é feita uma seleção visual para garantir que todos os minirrebolos estejam com as gemas saudáveis e, em seguida eles recebem um banho térmico com água;

3ª Etapa: Os minirrebolos são colocados em mesas ou em caixas de brotação, contendo substrato agrícola adequado para a produção de mudas, em seguida são levados à casa de vegetação ou para um ambiente com temperatura e umidade controlada;

4ª Etapa: Individualização ou “repicagem”, depois de doze dias na casa de vegetação ou em ambiente controlado, as gemas de cana-de-açúcar são individualizadas, e cada uma é colocada em um copo ou tubete próprio;

5ª Etapa: Aclimatação, a primeira fase de aclimatação dura cerca de quinze dias, é o período pelo qual a muda volta para a casa de vegetação e as raízes se desenvolvem;

6ª Etapa: Rustificação é a etapa de aclimatação a pleno sol, quando a muda é exposta as condições do ambiente que será cultivada, com irrigação reduzida e realização de podas semanais;

7ª Etapa: Muda pré-brotada, ao final de sessenta dias consiste em um período do ciclo completo da muda, onde ela é retirada do copo ou tubete em que foi plantada e já está pronta para levada ao campo.

As mudas já formadas permitem uma taxa de multiplicação de até quinze vezes maior. Isso porque a partir de uma tonelada de cana no sistema MPB, em um ano e meio pode chegar a uma área plantada entre trezentos até quinhentos hectares.

No plantio tradicional, a taxa de multiplicação ficaria em torno de trinta hectares para cada tonelada de toletes. O MPB muda o conceito de multiplicação de mudas que é usado desde meados de 1.530, com a chegada da cana-de-açúcar ao Brasil. É um método simples que pode ser adotado pelos pequenos produtores e associações de agricultura familiar, não ficando restrito apenas às unidades industriais.

4.2 Aspectos gerais da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) pertence à família das *Poaceae*, classificada como uma cultura semiperene com metabolismo fotossintético C4. Com a criação do Plano Nacional de Produção de Álcool (Proálcool) em 1975, houve uma grande expansão do setor sucroenergético, principalmente no interior do Estado de São Paulo, colocando o Brasil como um país de destaque na produção de energias renováveis (MOZAMBANI et al., 2006).

A cana-de-açúcar destaca-se no âmbito nacional como sendo uma cultura energética, devido à atual preocupação ambiental mundial o álcool é o

combustível do momento ao lado do biodiesel, tornando o Brasil o país com um grande potencial para produzir e exportar etanol (BRAGION, 2013).

A cana-de-açúcar pode alcançar produtividades ainda maiores quando são utilizadas técnicas de reforma do canavial com o plantio de mudas pré-brotadas (MPB). Ela é uma gramínea tropical perene, que se desenvolve em forma de touceira com perfilhos em sua base com mais de dois metros de altura e diâmetro com cerca de cinco centímetros (JAMES, 2004).

A folha da cana-de-açúcar é constituída por duas partes: bainha que liga a folha ao colmo da planta na base dos nós e a lâmina foliar que faz o processo de transpiração vegetal, respiração e fotossíntese. Possui a função de coletar a energia do meio externo, podendo chegar a 150 (cento e cinqüenta) centímetros de comprimento e 10 (dez) centímetros de largura, sendo uma das partes das plantas que diferem as variedades de cana-de-açúcar.

Como a cana-de-açúcar é uma planta do tipo C4, as altas eficiências fotossintéticas devem-se às altas intensidades luminosas. Com elevadas taxas de radiação, os colmos são mais grossos e curtos, as folhas são mais longas e verdes e o perfilhamento é mais intenso. Em condições de baixa irradiância, os colmos são mais finos e longos e as folhas são mais estreitas e amarelas (RODRIGUES, 1995). Quanto maior a quantidade luminosa, mais fotossíntese será realizada pela cultura e, maior será o seu desenvolvimento e acúmulo de açúcares (BARBIERI, 1981).

A temperatura é, provavelmente, o fator ambiental que mais influência no desempenho da cana-de-açúcar. De acordo com Fauconnier e Bassereau (1975), temperaturas abaixo de 25°C ocasionam um crescimento lento da planta. Entre 30°C a 34°C a planta alcança o crescimento máximo e, acima de 35°C, volta a ser lento, tornando-se praticamente nulo sob temperaturas superiores a 38°C.

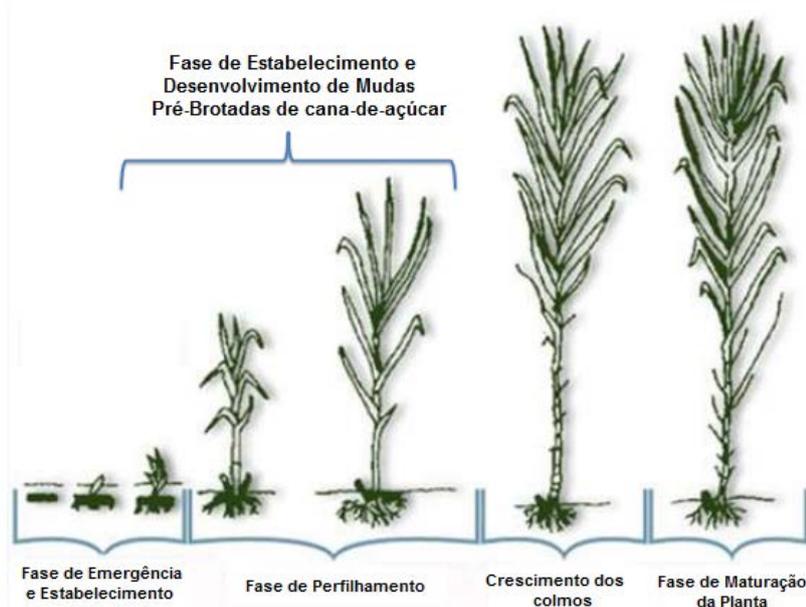
Segundo Barbieri, Bacchi e Villa Nova (1979), a temperatura ideal para germinação das gemas da cana-de-açúcar situa-se entre 32 a 38°C. O crescimento ótimo é obtido com temperaturas médias diárias entre 22 a 30°C e, acima de 38°C, o crescimento é muito lento. A taxa de crescimento se reduz com temperaturas abaixo de 20°C, sendo essa a temperatura basal para a cultura. Para a maturação e colheita, são desejáveis temperaturas relativamente baixas, entre 10 e 20°C, pois o tempo frio retarda a taxa de crescimento vegetativo e estimula o enriquecimento da sacarose na cana-de-açúcar.

A cana-de-açúcar, por se tratar de uma espécie de grande eficiência fotossintética, tem seu ponto de saturação luminosa elevado. Assim, quanto maior for à intensidade luminosa, mais fotossíntese será realizada pela cultura, o crescimento e o desenvolvimento da cultura serão mais eficientes e haverá um maior acúmulo de açúcares. De acordo com Barbieri (1981), o fotoperíodo é um importante fator para o desenvolvimento das culturas e afeta o comprimento dos colmos. Em fotoperíodos que variam entre 10 (dez) e 14 (quatorze) horas há um aumento no tamanho dos colmos. No entanto, em fotoperíodos longos, entre 16 (dezesesseis) a 18 (dezoito) horas, o colmo sofre redução em seu tamanho.

4.2.1 Fases morfológicas

Correspondem as mudanças que ocorrem na parte exterior da planta, ou seja, as transformações anatômicas vegetais que estão relacionadas ao seu ciclo. São as fases de como as plantas de um modo geral se desenvolvem ao longo de seus diferentes ciclos evolutivos: germinação, emergência, crescimento, desenvolvimento vegetativo, florescimento, frutificação, formação das sementes e maturação. Gascho e Shih (1983) dividem os ciclos de crescimento nas seguintes fases morfológicas: brotação e emergência, perfilhamento, crescimento dos colmos e maturação dos colmos.

FIGURA 1 – Etapas do crescimento evolutivo das mudas pré-brotadas.



Fonte: O autor.

A fase de brotação e emergência da planta se inicia quando ocorre o rompimento do broto nas folhas da gema e começa a se desenvolver em direção à superfície do solo, nesse mesmo tempo surgem às raízes do tolete. Já a fase de emergência do broto ocorre com cerca de vinte a trinta dias após o plantio (DAP).

O broto é um caule em miniatura que surge acima da superfície do solo, chamado de colmo primário. Essa fase depende da qualidade da muda, ambiente, época e manejo do plantio. Nesse período ocorre, ainda, o enraizamento inicial, com cerca de duas a três semanas após a emergência e o aparecimento das primeiras folhas. A fase de brotação do processo de produção de muda pré-brotada de cana-de-açúcar leva de quarenta a sessenta DAP com condições ambiental ideais até atingir a reserva vegetativa suficiente para ser plantada no campo.

O perfilhamento é o processo de emissão de colmos por uma mesma planta, os quais recebem a denominação de perfilhos, esse processo é regulado por hormônios e resulta no crescimento de brotos que vão em direção à superfície do solo. Esses brotos aparecem de vinte a trinta dias após a emergência do colmo primário.

Por meio desse processo, ocorre a formação da touceira e a população de colmos que será colhida. É importante destacar que a formação do sistema radicular da touceira é resultado do desenvolvimento das raízes de cada perfilho. O auge do perfilhamento é quando ocorre à total cobertura do solo pela folhagem das plantas, fase na qual cada touceira possui o máximo de perfilhos. Para cana planta provida do processo de produção de muda pré-brotada (MPB), essa fase leva de cento e oitenta a duzentos e dez DAP para chegar ao final, ou seja, situação em que a touceira de cana atingiu a estabilização no número total de perfilhos. A restrição hídrica pode ocasionar atraso no ciclo vegetativo da cultura e conseqüentemente um aumento no tempo dessa fase.

O crescimento dos colmos surge a partir do auge do perfilhamento, os colmos sobreviventes continuam o crescimento e o desenvolvimento, ganhando altura e iniciando o acúmulo de açúcar na base. O crescimento é estimulado por luz, umidade e calor. Durante essa fase, as folhas mais velhas começam a ficar amareladas e secam.

O crescimento do sistema radicular se torna mais intenso, tanto nas laterais quanto em profundidade. A maior parte das raízes está nos primeiros quarenta centímetros de profundidade, sendo esta a zona principal no que concerne

a absorção de água e nutrientes por parte da cultura. O canavial pode atingir altura acima de três metros, com a população final de colmos, variando em função das condições de clima, solo e variedade genética cultivada. A maturação dos colmos inicia-se junto com o crescimento intenso dos colmos sobreviventes do perfilhamento das touceiras.

4.2.2 Sistema radicular

Vasconcelos e Casagrande (2010) mencionam que logo após o plantio da muda, inicia-se o desenvolvimento do sistema radicular, com as raízes originárias a partir dos primórdios radiculares localizados na zona radicular dos colmos plantados, tendo a função de suprir os perfilhos recém-brotados com água e nutrientes do solo, juntamente com as reservas do tolete.

Após um período variável com as condições locais, cerca de trinta a quarenta e cinco dias, os primeiros perfilhos começam a emitir suas próprias raízes, a partir das zonas radiculares presentes nos próprios internódios (BEAUCLAIR; SCARPARI, 2007).

À medida que estas raízes vão se desenvolvendo, as raízes primárias vão perdendo sua função, a cana planta passa a depender exclusivamente das raízes dos perfilhos, todo o sistema radicular encontra-se distribuído nos primeiros trinta centímetros do solo (CASAGRANDE, 1991).

As raízes finas e fibrosas do tolete metabolizam até que as do colmo se desenvolvam e após essa etapa são extintas, já as raízes dos perfilhos são mais grossas, possui a coifa bem desenvolvida e penetram bem no solo. O sistema radicular é altamente ramificado do tipo fasciculado, melhor observado em sua parte superficial onde 85% encontram-se nos cinquenta primeiros centímetros e 60% nos primeiros vinte a trinta centímetros de forma orientada para baixo em sentido vertical (SEGATO; MATTIUZ; MOZAMBANI, 2006).

Cada perfilho comporta-se como sendo uma planta independente e cada um possui um sistema radicular próprio, podendo eventualmente trocar alguns nutrientes e água, pois continuam tendo ligações entre si. Assim, à medida que aumenta o perfilho, aumenta-se o volume de raízes explorando o solo até um ponto de estabilização, quando simplesmente ocorrem renovações das raízes velhas (BEAUCLAIR; SCARPARI, 2007).

Com a idade de três meses, as raízes primárias correspondem a menos de 2% da matéria seca da raiz (SMITH; INMAN-BAMBER; THORBURN, 2005). As raízes que têm origem na base dos perfilhos raramente se ramificam durante o início do desenvolvimento, sendo mais comum a ramificação quando o crescimento em alongamento é completado.

As radículas são densamente cobertas de pelos absorventes, conferindo-lhes maior superfície de absorção (CASAGRANDE, 1991). Em linhas gerais, Beauclair e Scarpari (2007) citam que o sistema radicular da cana-de-açúcar é bem distribuído ao longo do perfil do solo, mas com raízes de diferentes tipos.

As primeiras são raízes superficiais, localizadas nos primeiros trinta a quarenta centímetros do perfil do solo, são bem ramificadas e extremamente absorventes. Outro tipo são as raízes de fixação, que atingem profundidades maiores, ultrapassando facilmente cinquenta centímetros, entretanto, ao contrário do que sugere o nome, a função dessas não se restringe exclusivamente à fixação, pois podem perfeitamente absorver água e nutrientes, apesar de fazê-lo com menor eficiência do que as raízes superficiais. O terceiro são as raízes-cordão, formadas a partir de aglomerações de raízes verticais. Atingem profundidades superiores a cinco metros do perfil do solo, fornecendo acesso a reservas profundas de água no solo, principalmente em períodos de grande estiagem (MAURI, 2012).

4.3 Polímero Hidrorretentor

Na década de 80 foram desenvolvidos vários tipos de polímeros sintéticos com diferentes finalidades, também conhecidos como polímeros hidrorretentores, alguns recomendados para a utilização agrícola como condicionadores de solo, devido à sua capacidade de melhorar as propriedades físico-químicas do solo (KAMPF, 1999). Santoni et al. (2008), relatam ainda, que os polímeros são formados por redes poliméricas tridimensionais de alto peso molecular e com caráter hidrófilo, capazes de absorver grandes quantidades de água e fluídos biológicos.

O uso de condicionadores sintéticos tem contribuído para aumentar a capacidade de retenção de água, reduzindo a frequência de irrigação e permitindo a utilização mais efetiva dos recursos solo e água, contribuindo para melhorar o rendimento das culturas (NIMAH; RYAN; CHAUDHRY, 1983; WANG; BOOGER,

1987). Esses polímeros poderiam reduzir o estresse hídrico causado pelo plantio raso, como citado por Coleti e Stupiello (2006). Nos Estados Unidos da América e na Europa a utilização de polímeros sintéticos na agricultura, como condicionadores de solo, têm sido amplamente estudada, entretanto, a grande maioria dos estudos publicados é realizada com os polímeros aniônicos, que atuam estruturando o solo, controlando a erosão, melhorando a infiltração de água e ajudando na recuperação de solos salinos (WALLACE; WALLACE; ABOUZAMZAM, 1986; SHAINBERG; LEVY, 1994).

Poucos são os estudos realizados com os polímeros hidroabsorventes que têm atuação direta na retenção de água. Esses polímeros não reagem com os constituintes do solo, mas exercem efeito direto, aumentando a retenção de água pelo solo (NIMAH; RYAN; CHAUDHRY, 1983). O principal atributo de um polímero é de absorver água, que é armazenada e depois devolvida ao meio quando necessário (FONTSERÉ, 2003). A aplicação de hidrogeis em associações com o substrato orgânico e quando se espera a retenção hídrica, sua utilização fica comprometida, devido seu alto custo. Porém, os hidrogeis apresentam-se eficientes na diminuição de condutividade hidráulica, conseguindo reter mais água no solo, sendo aumentada sua capacidade à medida que se aumenta as doses (GERVÁZIO; FRIZZONE, 2004).

Os polímeros segundo Fontseré (2003) são divididos em três grupos:

Grupo 1: Polímeros que devido à forte ligação de hidrogênio, depois de hidratados não podem ser desidratados, usual em fraldas descartáveis.

Grupo 2: Polímeros com grande capacidade de reter água, porém apresenta tempo curto de retenção, perdendo água com facilidade, empregado nas atividades de filtração e decantação.

Grupo 3: Polímeros com fraca interação com hidrogênio, conferindo propriedades de hidratação, podendo armazenar água por longos períodos de tempo e se desidratar, cedendo água para o meio por difusão de massas. Seu uso é característico para a agricultura, sendo usado na Espanha em trabalhos de reflorestamento e áreas de regeneração de vegetação.

A degradação dos polímeros não ocorre biologicamente, e sim sofre uma degradação paulatina ou dissociação por ação do cultivo e dos raios ultravioletas do sol, em um contínuo fracionamento, próximo de 10% anual, em solos cultivados de forma contínua por implementos agrícolas, supondo ainda, uma

permanência no solo por dez anos (AZZAM, 1983). De acordo com Johnson (1984), James e Richards (1986), a deterioração do polímero é acelerada quando colocado em soluções de sais de Ca, Mg, Fe e K, conseqüentemente em solos que recebem adubação anualmente o polímero vai ser exposto à deterioração mais acelerada, reduzindo o período de permanência no solo para quatro a cinco anos. Wallace, Wallace e Abouzamzam (1986) afirmam que a dissociação do polímero resulta em dióxido de carbono, água e amoníaco, portanto não existe nível de toxicidade residual, que possa acarretar em problemas ambientais.

4.4 Biofábrica de Mudanças

Através do melhoramento genético é possível conseguir grandes avanços na identificação de cultivares de cana-de-açúcar com características agrícolas superiores. Porém, à medida que novos cultivares passam a ter expansão em escala comercial, a possibilidade de infecção por meio de microorganismos patogênicos aumenta, levando muitas vezes a depreciação das mesmas. A cultura de meristema em cana-de-açúcar visava no seu início, na década de 90 do século passado, principalmente a limpeza de variedades que naquela época estavam em fraco declínio em função de severos ataques de patógenos, alguns já tradicionais, outros recém introduzidos. Dentro de uma visão mais atual de procura de alta qualidade de matéria prima entregue para a industrialização, além da necessidade de ganhos crescentes de produtividade de maneira a sobreviver aos contínuos choques na economia, a demanda técnica vem de encontro aos fundamentos do processo de cultura de tecidos através da oferta ampla de material atualizado em relação às características agroindustriais requeridas pelo setor, adiantando-se na expansão de cultivares potencialmente promissor e da possibilidade de formação de um banco genético de mudas saudáveis e geneticamente idênticas.

Sendo assim, a propagação vegetativa *in vitro* ou micropropagação, através de biofábricas, apresenta inúmeras vantagens, como: multiplicação rápida e uniforme de plantas, produção de mudas livres de doenças (fungos, vírus e bactérias, por exemplo), programação e agendamento da produção durante todo o ano. Isto estabelece uma melhoria no padrão e rendimento da produção, implicando em uma maior competitividade do setor produtivo, no caso o sucroenergético, gerando aumento de renda e postos de trabalho no campo e nas cidades.

Biofábrica é um laboratório que utiliza biotecnologia, principalmente técnicas de cultura de tecidos, para a produção de mudas sadias em larga escala (Lee et al., 1984). Existem muitas vantagens na utilização de biofábricas para produção de mudas pré-brotadas. Pode-se produzir grande quantidade de mudas com alta qualidade fitossanitária e homogeneidade o ano todo, garantindo postos de trabalho aos pequenos produtores.

4.5 Metodologia de Micropropagação

O desenvolvimento de técnicas de cultura de células e tecidos tem sido uma das contribuições mais significativas para o avanço do processo de micropropagação vegetal. A micropropagação é a técnica alternativa mais utilizada, com a finalidade de obtenção de um grande número de plantas uniformes, independente da época do ano (BORTHAKUR; HAZARIKA; SINGH, 1999; SOARES et al., 2007).

Altas taxas de multiplicação de cana-de-açúcar podem ser alcançadas pelo método de micropropagação, 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 (MALHOTRA, 1995; PAULA CIDADE et al., 2006). Na década de setenta do século passado, quando a técnica de micropropagação ganhou grande impulso, Murashige (1974) apresentou o conceito de estágios de desenvolvimento no processo de propagação *in vitro*. Este esquema, padrão para sistemas de micropropagação, divide-se em:

Estágio I - Seleção de explantes, desinfestação e cultura em meio nutritivo sob condições assépticas;

Estágio II - Multiplicação dos propágulos mediante sucessivos subcultivos em meio próprio para a multiplicação;

Estágio III - Início da indução e iniciação radicular e a preparação para a aclimatização;

Estágio IV - Transferência das partes aéreas produzidas para meio de enraizamento e subsequente transplante das plantas obtidas para substrato ou solo.

Segundo o mesmo autor, este esquema não precisa necessariamente ser seguido, permitindo alterações conforme as peculiaridades de cada espécie. Pode ser necessário uma fase adicional de alongamento das partes aéreas antes do

enraizamento, ou o esquema pode ser simplificado, eliminando-se a etapa de enraizamento *in vitro* pela manipulação das partes aéreas como microestacas, as quais enraízam diretamente no substrato de transplântio (MURASHIGE, 1974).

A organogênese direta refere-se ao surgimento de gemas a partir de tecidos que apresentam potencial morfogenético na planta *in vitro*, mas que, em geral, não se expressa (SOARES et al., 2007). Esses tecidos incluem câmbio vascular, base de pecíolo em dicotiledôneas, base de folhas e escamas em bulbos de monocotiledôneas segmentos de raízes, entre outros.

A organogênese indireta ocorre quando o processo de regeneração de gema é precedido pela formação de calo. A partir de células não-organizadas do calo, surgem gemas adventícias que crescem e se desenvolvem em novas partes aéreas. As multiplicações sucessivas podem dar-se pela subdivisão do calo e manutenção de um sistema adventício, ou pela alteração do processo para a proliferação axilar. Seja qual for à maneira, as partes aéreas produzidas são individualizadas, dão origem a plantas completas que são enraizadas e transplantadas (PAULA CIDADE et al., 2006).

Por sua vez, a embriogênese somática também pode ser classificada como direta ou indireta. Na forma direta, os embriões somáticos são formados a partir de células que já estão determinadas e competentes para o desenvolvimento embriogênico, antes da condição de explante, sem a ocorrência da fase de calo. Na forma indireta, primeiro há uma fase de redeterminação das células diferenciadas do explante, seguida da ativação da divisão e proliferação celular, que levam à formação do calo e, na segunda fase, ocorre o desenvolvimento dos embriões a partir de determinadas células do calo (GAJ, 2004; SILVA, 2012).

Uma vez estabelecida, as culturas passam a ser fonte contínua de micro explantes que podem ser continuamente multiplicadas e virem a resultar em novas plantas, as quais são aclimatadas em condições de casa de vegetação, sem interrupção sazonal.

4.5.1 Iniciação e estabelecimento da cultura

Esta etapa inicia-se com a seleção dos explantes mais adequados para a micropropagação, e termina com a obtenção de uma cultura livre de

contaminantes e adaptada à condição de cultivo *in vitro*. A cultura deve apresentar reação à aplicação de fitorreguladores na fase seguinte de multiplicação.

Sabe-se que o estado fisiológico da planta, de onde serão retirados os explantes, tem grande influência no posterior comportamento das culturas. Obviamente, a primeira consideração diz respeito ao estado nutricional da planta e à fase de crescimento em que se encontra. Plantas bem nutrida, sem sintomas de deficiência nutricional ou hídrica, em geral, fornecem explantes melhores. A técnica de propagação desta espécie por meio de meristema apical é considerada uma alternativa vantajosa para a multiplicação de diversas variedades, 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 20 (vinte) e 80 (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 e Bacchi (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 ou até 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 microrganismo 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; MACHADO, 2005). Mesmo considerando microrganismos contaminantes superficiais, o fato de levar menos tecido para condições assépticas por si somente já colabora para a redução da quantidade desses microrganismos. 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 freqüentemente explantes muito pequenos não conseguem crescer, ou demoram muito antes de fazê-lo.

4.5.2 Desinfestação

A dificuldade maior nesta etapa reside em se obter tecido descontaminado sem conduzi-lo à morte após o seu isolamento (LEE; BACCHI, 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, tais como o hipoclorito de sódio e de cálcio. Outros agentes desinfetantes usados incluem o cloreto de mercúrio, o ácido clorídrico, o cloreto de benzalcônio e o peróxido de hidrogênio (água oxigenada).

As concentrações das soluções desinfetantes assim como as combinações dos princípios ativos desinfetantes e os tempos de exposição podem variar muito. 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; BACCHI, 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.

4.5.3 Incubação

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 $\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 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 subcultivos podem rejuvenescer os tecidos, tornando a cultura reativa e encurtando a fase de estabelecimento, num fenômeno chamado "rejuvenescimento *in vitro*" (BOULAY, 1984; FRANCKET 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 subcultivos, 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.

4.5.4 Fase de multiplicação

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 satisfatório com o mínimo de variação de explante para explante (LEE; BACCHI, 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.

4.5.5 Fase de enraizamento

Esta etapa 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; BACCHI, 1984; PAULA CIDADE et al., 2006). A rizogênese ocorre de uma a três semanas e pode ser dividida em indução, iniciação e alongamento de raízes.

4.5.6 Fatores do ambiente que influenciam o cultivo *in vitro*

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 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 repetibilidade 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 (para uma revisão sobre o assunto, veja 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 subcultivo adotado, as condições ambientais e microambientais 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 freqüentemente restringem a repetição dos resultados, dificultando a determinação de um protocolo efetivamente comercial de micropropagação.

4.5.7 Composição do meio de cultura

O meio de cultura pode ser sólido (com partículas sólidas), semi-sólido (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.

A composição do meio de cultura, em termos de macro e micro elementos e dos elementos orgânicos, também apresenta importância e, sendo assim, ao iniciar um processo biotecnológico com células vegetais, deve-se, em primeira instância, estabelecer a formulação adequada do meio que será utilizado (DRAPEAU; BLANCH; WILKE, 1986). As plantas cultivadas *in vitro* são susceptíveis à composição do meio em que vivem. Conforme os autores, através de mudanças apropriadas na composição do meio e nas condições de cultivo podem ser possíveis estimular virtualmente todas as células numa cultura para torná-las biossinteticamente ativas por um período prolongado de tempo.

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; 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_2 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; 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; ZHONG, 1997) e atua no metabolismo energético, na regulação de processos enzimáticos e na ativação de enzimas (SANTIAGO et al., 2001; GUERRA; 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; ROBERTS, 1995).

Vitaminas – Dentre as mais citadas têm-se a tiamina, inositol, ácido nicotínico, piridoxina e ácido ascórbico as quais estão incluídas no meio MS. Dessas vitaminas, a tiamina é uma das que aparece como essencial para a maioria das plantas, enquanto que o ácido nicotínico e a piridoxina podem estimular o crescimento dos tecidos em muitos casos.

Fonte de carbono – os meios de culturas requerem a presença do Carbono como fonte de energia e para sintetizar os constituintes celulares, a sacarose e a glicose aparecem como sendo os compostos mais utilizados, apesar de células vegetais crescerem em diversas fontes de carboidratos.

4.5.8 Hormônios

Os hormônios são biomoléculas produzidas pelas plantas, cuja função, é proporcionar crescimento das estruturas do vegetal. Entre essas biomoléculas estão às auxinas, citocininas, giberelina, entre outras. Porém, é possível a produção dessas biomoléculas sinteticamente, são os chamados reguladores de crescimento, cuja função é semelhantes a dos hormônios (CID & TEIXEIRA, 2010).

Na cultura de tecidos, as auxinas e as citocininas, sejam naturais ou sintéticas, são os fitoreguladores mais utilizados (CID & TEIXEIRA, 2010). Para preparo dos meios de cultura são adicionadas doses do hormônio ou regulador de crescimento em proporções adequadas para não causar inibição e nem estimulação exagerada de crescimento (COUTINHO, 1973).

As auxinas, segundo Coutinho (1973), constituíram o primeiro grupo de fitormônios a ser identificado como tal. As observações mais significativas a respeito destas substâncias datam de 1880, quando Charles Darwin demonstrou, de maneira simples, a fotossensibilidade do ápice de coleóptiles de sementes recém germinadas de alpiste (*Phalaris canariensis*).

As auxinas são produzidas pelo ápice dos caules, folhas, raízes e embriões de sementes. As funções que elas apresentam nos vegetais não necessariamente ficam limitadas ao crescimento, mas funciona, também, como inibidor de crescimento e como estimulador de divisão celular. Todavia, elas influenciam no crescimento do vegetal não pelo aumento de número de células e sim pelo alongamento das mesmas. Sem a presença das auxinas ocorreria a lise da parede celular pelo fato de a mesma não suportar a distensão das células (COUTINHO, 1973).

O ácido β -in-dolil-acético (AIA) é a auxina que apresenta maior abundancia no vegetal. Já o ácido inolil-acético (NOA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D) e ácido α -naftaleno-acético (ANA), são produzidos sinteticamente (COUTINHO, 1973).

As citocininas são hormônios que atuam na citocinese celular, ou seja, na divisão citoplasmática. Segundo Coutinho (1973), este grupo de substâncias reguladoras do crescimento e do desenvolvimento das plantas foram descobertas em 1955 por Miller e colaboradores. Assim o hormônio recebeu o nome de citocinina, devido à sua ação sobre a citocinese.

As citocininas podem ser encontradas nas raízes e posteriormente são distribuídas para os novos brotos ocorrendo assim à divisão das células. Coutinho (1973) relata que para a citocinina cumprir seu papel, é necessário que esteja em conjunto com doses de auxinas. Se a proporção de citocinina for baixa, há intensa produção de raízes e pouco desenvolvimento de calos. Em uma proporção intermediária há proliferação somente de calos sem qualquer diferenciação dos mesmos. Quando a proporção de citocinina é mais elevada, o calo desenvolvido inicialmente origina um grande número de brotos caulinares. Como exemplo de citocinina encontrada nos vegetais pode-se citar a zeatina e como citocinina sintética, a cinetina.

4.5.9 Temperatura

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).

4.6 Uso da biotecnologia para uma agricultura sustentável

O estabelecimento de uma agricultura sustentável, que preserve o meio ambiente e proporcione segurança alimentar futura, é um fator primordial para o desenvolvimento da humanidade ante as mudanças climáticas e o declínio das reservas energéticas não renováveis. Diante das previsões de crescimento populacional mundial, atingindo nove bilhões de habitantes em 2050 (Ash et al., 2010), existe o desafio de criar métodos avançados e eficientes para aumentar a produção de alimentos e energia renovável sem, contudo, esgotar os recursos naturais.

Em 2050, o mundo provavelmente estará vivendo sob a influência de três grandes crises anunciadas: a diminuição das reservas de petróleo, a escassez

de água potável e a falta de alimentos para grande parte da população. Nesse cenário, a biotecnologia de plantas ocupa papel central na busca de soluções para atenuar os problemas, atuais e futuros, causados pelo estilo de vida adotado pelo homem. No Brasil, o desenvolvimento do etanol combustível mostrou ser uma alternativa viável para reduzir a dependência do petróleo. Entretanto, a maioria das regiões agriculturáveis do planeta não possui as condições edafoclimáticas necessárias para o cultivo de plantas com potencial para a produção de biocombustíveis. Em contrapartida, o cultivo extensivo e exclusivo de plantas para a produção de energia pode gerar problemas no abastecimento de alimentos para a população, como escassez e elevação de preços. Nesse contexto, a biotecnologia vegetal se insere como propulsora para o aumento da produtividade, da qualidade da produção e para o desenvolvimento de plantas adaptadas a diversas condições ambientais de espécies com potencial energético (Beer et al., 2009).

De acordo com a Organização das Nações Unidas (ONU), estima-se que há no mundo mais de 1,2 bilhão de pessoas sem acesso à água potável, representando cerca de 20% da população mundial (Unesco, 2013).

A agricultura é responsável por cerca de 70% do consumo de água do planeta (FAO, 2017), e o uso descontrolado de inseticidas e fertilizantes contribui para a contaminação da água de lençóis freáticos e mananciais subterrâneos. Para aperfeiçoar a eficiência do uso da água na agricultura, a biotecnologia vegetal atua em duas frentes: no desenvolvimento de espécies tolerantes a seca, diminuindo a irrigação intensiva e conservando a água no solo, e no melhoramento genético de variedades para resistência a pragas e doenças, reduzindo a necessidade da utilização de produtos químicos nas lavouras (Takeda; Matsuoka, 2008).

A biotecnologia pode auxiliar no desenvolvimento de plantas e métodos com maior potencial para a produção de biocombustíveis, sem a necessidade de aumento na área cultivada. Em um futuro próximo, o desenvolvimento de biocombustíveis de segunda geração pode elevar os índices de produção de combustíveis por área plantada com culturas de potencial energético.

No caso da cana-de-açúcar, os biocombustíveis de primeira geração são aqueles produzidos a partir da fermentação dos açúcares presentes no suco da cana, para a produção do etanol. Já os biocombustíveis de segunda geração são aqueles obtidos a partir da celulose presente no bagaço, que é utilizada na produção de álcool combustível.

Assim, a biotecnologia pode auxiliar no desenvolvimento de variedades ricas em celulose, visando a uma maior eficiência na produção de etanol. O maior benefício da biotecnologia vegetal para a humanidade, entretanto, será, sem sombra de dúvidas, a produção de plantas melhoradas geneticamente, fornecendo suporte para as exigências atuais e futuras de segurança alimentar, para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável e para a preservação dos recursos naturais.

4.7 Medição do teor de clorofila via índice SPAD

As clorofilas são pigmentos que refletem a cor verde e estão diretamente associadas com o potencial da atividade fotossintética. A alta eficiência fotossintética pode levar ao incremento de produtividade agrícola, e essa relação está diretamente relacionada com o aproveitamento da radiação disponível por esses pigmentos. As elevadas produtividades obtidas com as gramíneas tropicais (C4) são resultados de elevada eficiência fotossintética conjugada a ambientes favoráveis (BERNARDES, 1987).

Os pigmentos envolvidos na fotossíntese são as clorofilas a e b, e os carotenóides. A clorofila a é o pigmento utilizado para realizar a fotoquímica (o primeiro estágio do processo fotossintético), enquanto que os demais pigmentos auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação, sendo assim chamados de pigmentos acessórios (STREIT et al., 2005). Os carotenóides são pigmentos amarelos ou alaranjados, mas normalmente sua coloração é mascarada pelas clorofilas. Esses pigmentos situam-se nas lamelas dos cloroplastos, em íntima associação com as clorofilas, o que permite a transferência de energia para as clorofilas (TAIZ; ZEIGER, 2009).

O estresse por seca é normalmente caracterizado por perda de clorofila e um declínio progressivo na capacidade fotossintética das plantas. O que leva a análise dos pigmentos fotossintéticos a ser uma importante ferramenta para avaliação da sanidade e integridade dos aparatos internos da célula durante o processo de fotossíntese (RONG-HUA et al., 2006) e fornece uma precisa técnica de detecção e quantificação de plantas tolerantes ao estresse hídrico (JABEEN; SHAHBAZ; ASHRAF, 2008).

O medidor portátil de clorofila SPAD-502 permite leituras instantâneas do teor relativo de clorofila na folha sem destruí-la, fazendo com que tal método seja caracterizado pela simplicidade e rapidez (ARGENTA et al., 2001).

Em adição, medições com SPAD-502 podem ser significativamente correlacionadas com o conteúdo de nitrogênio em folhas de gramíneas temperadas e tropicais, auxiliando, sobremaneira nos processos de seleção e melhoramento de plantas (ARGENTA et al., 2001; GÁBORCÍK, 2003).

As leituras são instantâneas e revelam a intensidade da cor verde da folha (valor correspondente ao teor relativo de clorofila) sem destruí-la. Os valores são calculados pelo equipamento com base na quantidade de luz transmitida pela folha, em dois comprimentos de ondas, com diferentes absorbâncias da clorofila (TORRES NETTO et al., 2005; AMARANTE et al., 2010). O medidor de clorofila SPAD-502 pode ser utilizado em plantas intactas em qualquer momento do processo de crescimento das folhas e os valores obtidos podem ser descritos como índice, valor ou leitura SPAD (MINOLTA CAMERA, 1989).

Uma boa associação entre o índice SPAD e o conteúdo de clorofila em plantas submetidas a vários regimes hídricos tem sido relatada, por exemplo, em plantas de cana-de-açúcar (JANGPROMMA et al., 2010), amendoim (ARUNYANARK et al., 2009) e sorgo (XU; ROSENOW; NGUYEN, 2000). De acordo com Silva et al. (2014), plantas de cana-de-açúcar com longo tempo de seca, cerca de 90 dias, tiveram redução no índice SPAD, sendo mais severa em genótipos susceptíveis.

4.7.1 Pigmentos fotossintéticos: clorofila a e b

As clorofilas (a e b) e os carotenóides são os pigmentos fotossintéticos mais abundantes existentes no planeta. Por sua estrutura química ser instável, as clorofilas é facilmente degradado, resultando em produtos de decomposição que modificam a percepção e qualidade dos vegetais (GONÇALVES, 2008).

As clorofilas localizam-se nos cloroplastos, sendo esta organela o local que se realiza a fotossíntese, a qual possui duas reações importantes: a fotoquímica, nas membranas dos tilacóides e a bioquímica, no estroma do cloroplasto. Tais organelas, além das clorofilas, contêm outros pigmentos

denominados acessórios, tais como os carotenóides (carotenos e xantofilas) (LARCHER, 2000; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Ao absorver os fótons (energia luminosa), as moléculas de clorofila modificam-se temporariamente suas configurações eletrônicas, passando do estado basal para o estado excitado, o qual possui nível de energia superior, sendo ainda muito instável e de vida curta. Assim, após absorver os fótons, esses pigmentos podem dissipar o excesso de energia proveniente da luz por meio de quatro formas competitivas: dissipação fotoquímica (utilizada na fotossíntese), fluorescência (re-emissão na forma de luz), conversão direta de energia (retorno da clorofila ao seu estado base sem ocorrer emissão de fótons) e dissipação não-fotoquímica (re-emissão na forma de calor) (TAIZ; ZEIGER, 2004; MAXWELL; JONHSON, 2000; CAMPOSTRINI, 2010).

4.7.2 Pigmentos fotossintéticos e Eficiência fotoquímica do fotossistema II

Sendo o principal pigmento responsável pela captação da energia luminosa utilizada no processo de fotossíntese, constitui um dos principais fatores relacionados à eficiência fotossintética de plantas e conseqüentemente ao crescimento e adaptabilidade a diferentes ambientes (RÊGO; POSSAMAI, 2004). A energia luminosa utilizada na fotossíntese é absorvida pelos pigmentos fotossintéticos (clorofila a e b e carotenóides). Quando uma luz branca, como a do sol, atinge as clorofilas, é absorvida nos comprimentos de onda correspondentes ao azul e vermelho. A luz verde não é absorvida e sim refletida, o que explica a coloração verde desses pigmentos (LICHTENTHALER, 1987).

Quando as moléculas de clorofila absorvem energia luminosa (fótons) alteram suas configurações eletrônicas, passando para um estado mais excitado (nível de energia mais alto), que é muito instável. Após receberem a energia dos fótons, dissipam essa energia de três formas: dissipação fotoquímica, fluorescência e dissipação não fotoquímica (CAMPOSTRINI, 1997).

Dissipação fotoquímica: é a utilização da energia luminosa nos processos fotoquímicos da fotossíntese, onde ocorre a doação do elétron proveniente da molécula de água para o acceptor NADP (Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato). Fluorescência: emissão da radiação em comprimentos de

onda visíveis (vermelho e vermelho distante). Dissipação não fotoquímica: é a dissipação na forma de calor, como radiação infravermelha.

Esses três processos de dissipação são competitivos, assim, alterações nas taxas fotossintéticas e na dissipação do calor causarão alterações na fluorescência, da mesma forma, alterações na fluorescência podem indicar comprometimento no processo fotossintético (CAMPOSTRINI, 1997). Com a adaptação do tecido fotossintético ao escuro, cerca 30 minutos (LARCHER; CERNUSCA, 1985), a fase bioquímica da fotossíntese fica desativada, dessa forma, quando é aplicado um pulso de luz saturante, as moléculas de clorofila se excitam, porém os aceptores de elétrons não estão aptos para recebê-lo. Assim, essa energia é dissipada em forma de fluorescência e de calor (CAMPOSTRINI, 1997).

A fluorescência pode ser medida por um fluorímetro. Esse aparelho fornece várias medidas, entre elas a máxima eficiência fotoquímica do fotossistema II (F_v/F_m), que é um bom indicador do dano fotoinibitório quando as plantas estão sob efeito de estresse, como frio (BAKER; EAST; LONG, 1983) e seca (ÖGREN E ÖQUIST, 1985).

Fatores como horários da medição, estação de crescimento, a posição da folha, tempo de adaptação ao escuro, temperatura e intensidade de luz durante o ensaio podem influir nas medidas de fluorescência da clorofila. Portanto, para evitar erros experimentais e falhas nas interpretações dos dados, é importante minimizar a influência dos fatores externos durante as avaliações (CAMPOSTRINI, 1997).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local do experimento

O experimento foi desenvolvido no Centro de Estudos Avançados em Bioenergia e Tecnologia Sucroalcooleira (CENTEC) e posteriormente no Laboratório de Citogenômica e Bioinformática (LCGBI), ambos localizados no Campus II da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), situada no Oeste do Estado de São Paulo, no município de Presidente Prudente (51° 26'00" de Longitude Oeste de W.G e 22° 07'30" de Latitude Sul) a uma altitude média de 433 metros. O clima da região é classificado como subtropical com temperatura e precipitação média anual de 23,1°C e 1.244mm, respectivamente, com verão quente e inverno com temperaturas moderadas e baixa precipitação (estação seca) (SETZER, 1966).

O híbrido interespecífico estudado foi à cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.), os cultivares avaliados foram CTC 9002, IAC 91-1099 e o IACSP 95-5000. Colhidos em uma área agrícola classificada como latossolo vermelho arenoso, típico da região Oeste Paulista.

5.2 Retirada dos colmos, corte e seleção individual dos minirrebolos

A retirada dos colmos de cana-de-açúcar foi realizada em viveiros com idade fisiológica de seis a dez meses, o que permitiu um maior aproveitamento das gemas axilares ao longo do colmo. As folhas e as palhas foram removidas no próprio campo durante a colheita, sendo um local isolado do núcleo de produção das mudas, evitando assim o eventual transporte de pragas agrícolas para o local de instalação e cultivo das plantas, essa atividade foi realizada manualmente, o que reduziu danos físicos às gemas axilares.

Os colmos de cana-de-açúcar ao chegarem à sala de experimentação foram devidamente separados por cultivares, em seguida todos eles foram lavados com água corrente e sabão neutro para remoção de terra e outros tipos de resíduos oriundos do campo (Figura 2).

FIGURA 2: Colmos de cana-de-açúcar lavados e prontos para o corte.



Fonte: O autor.

Fonte: O autor.

Após a limpeza externa de todos os colmos, foi utilizada para cortar os minirrebolos uma guilhotina semi-automática de lâmina dupla, conforme apresentado na Figura 3, essa lâmina dupla de corte foi devidamente esterilizada com produtos à base de amônia quaternária, com intuito de evitar contaminação e oxidação durante a preparação dos minirrebolos (gema individualizada).

FIGURA 3: Guilhotina semi-automática de lâmina dupla para cortar os minirrebolos.



Fonte: O autor.

Fonte: O autor.

O espaçamento entre as lâminas da guilhotina determina o tamanho do minirrebolo, que para esse modelo de multiplicação de mudas, sugere-se que seja de três centímetros, viabilizando posteriormente o emprego da gema individualizada dentro do copo plástico de 180 (cento e oitenta) mililitros. Nesta etapa, foi possível realizar uma seleção individualizada das melhores gemas, essa seleção eliminou do

processo os minirrebolos com sintomas de *Diatraea saccharalis* e eventuais danos mecânicos das gemas axilares (Figura 4).

FIGURA 4: (a) Corte dos colmos de cana; (b) Obtenção dos minirrebolos.



(a) Fonte: O autor.

(b) Fonte: O autor.

5.3 Tratamento térmico dos minirrebolos

Após o corte dos colmos de cana-de-açúcar e o preparo dos mesmos em minirrebolos, foi feita uma seleção visual e individual em cada uma das gemas para garantir que todas elas estivessem com as condições saudáveis e viáveis para o plantio, em seguida cada um dos três cultivares avaliados foram devidamente separados em três sacos de estopa identificados, após esse procedimento as gemas receberam um tratamento térmico com água em banho-maria a 52 °C por 30 (trinta) minutos, com o objetivo de ampliar a sanidade e o vigor inicial das mudas pré-brotadas (Figura 5).

FIGURA 5: (a) Separação dos cultivares em sacos; (b) Tratamento térmico.



Fonte: O autor.

(b) Fonte: O autor.

5.4 Instalação dos minirrebolos na mesa de brotação

Após o tratamento térmico, realizou-se o plantio na sala de experimentação do CENTEC, com a aferição da temperatura e da umidade diariamente. As mesas de plantação foram fabricadas com restos de madeirite da construção civil da própria universidade. Em cada uma das divisórias da mesa de brotação foram plantados 80 (oitenta) minirrebolos de cana-de-açúcar, em seguida todos eles foram cobertos com substrato agrícola Carolina Padrão® (Tabela 1), e mantidos a uma temperatura entre 30 a 35°C, que ficaram por trinta dias. Todos os minirrebolos foram plantados com três centímetros de comprimento e com dois centímetros de profundidade. As gemas foram voltadas para cima.

TABELA 1: Resultado de Análise de Tecido Vegetal (Macro e Micronutrientes) do substrato Carolina Padrão®, utilizado na realização do experimento.

RESULTADO DE ANÁLISE DE TECIDO VEGETAL												
AMOSTRA	MACRONUTRIENTES (g Kg ⁻¹)						MICRONUTRIENTES (mg Kg ⁻¹)					
SUBSTRATO	N	P	K	Ca	Mg	S	Na	B	Cu	Fe	Mn	Zn
CAROLINA PADRÃO®	total											
	6,4	0,81	2	6,4	9,9	1,1	****	35	14,3	3.099,9	159	43

Metodologia de Análise: Avaliação do Estado Nutricional das Plantas: Princípios e Aplicações. 2ª edição. Malavolta et al. (1997).

Dentre as principais características observadas no substrato utilizado para a realização do experimento foi à uniformidade na composição, baixa densidade, porosidade adequada, boa capacidade de retenção de água, isento de pragas e organismos patogênicos, isento de sementes de plantas daninhas, boa aderência junto às raízes e economicamente viável.

Nesta fase, a irrigação foi realizada com regador de mão, dividida em dois períodos (manhã e tarde), em cada um dos períodos foi irrigado 7,5 milímetros de água, totalizando quinze milímetros de irrigação por dia em cada uma das parcelas da mesa, quantidade suficiente para garantir a manutenção fisiológica do processo de pré-brotação das plantas. Cada divisória da mesa de brotação, aqui chamada de (parcela), apresenta 109 (cento e nove) centímetros de comprimento,

73 (setenta e três) centímetros de largura e 10 (dez) centímetros de altura e/ou profundidade (Figura 6).

FIGURA 6: (a) Instalação dos minirrebolos na mesa; (b) Irrigação manual.



(a) Fonte: O autor.

(b) Fonte: O autor.

5.5 Emergência e pré-brotação das plântulas

A emergência vegetal é o primeiro sinal que a planta realiza quando sai do substrato ou do solo. Ocorre com cerca de vinte a trinta dias após o plantio. A brotação é a emergência do caule em miniatura, também chamado de colmo primário, nessa fase as raízes do minirrebolo estão maiores e com maior capacidade de absorver água e nutrientes, enquanto que a brotação se apresenta com a espessura de cinco a oito milímetros ao nível da superfície do substrato (Figura 7).

FIGURA 7: Emergência e pré-brotação das plântulas de cana-de-açúcar.



Fonte: O autor.

Fonte: O autor.

5.6 Individualização

A individualização ou “repicagem” aconteceu logo após o período de pré-brotação das plantas na mesa (Figura 8a), onde ocorreu um segundo processo de seleção, as gemas que não emergiram ou que não brotaram foram descartadas e as que brotaram foram transferidas para copos plásticos descartáveis de 180 mL, contendo substrato agrícola Carolina Padrão[®], com o emprego das respectivas doses do polímero hidrorretentor: (0; 5; 10; 20; 40 g L⁻¹), devidamente hidratado (Figura 9b), este manejo para o copo com o polímero já hidratado contribuiu de forma significativa para o bom desenvolvimento da planta e não permitiu que no momento da irrigação das mudas o gel que foi empregado ao substrato pudesse jogar o minirrebolo para fora do copo (Figura 8b).

FIGURA 8: (a) Individualização das mudas; (b) Processo de repicagem.



(a) Fonte: O autor.

(b) Fonte: O autor.

FIGURA 9: (a) Polímero in natura;

(b) Polímero hidratado.



(a) Fonte: O autor.

(b) Fonte: O autor.

5.7 Aclimação - Fase 1

Após a individualização, os copos plásticos com as gemas brotadas foram transferidos para aclimação na casa de vegetação por um período de trinta dias (Figura 10). Nos primeiros sete dias utilizou-se uma proteção na parte superior da casa de vegetação com tela de sombrite a 50%, a qual no decorrer da etapa foi sendo retirada. Este procedimento associado à manutenção de elevada umidade relativa do ar no ambiente, tem como objetivo minimizar os efeitos negativos de altas temperaturas. As lâminas e os turnos de irrigação foram definidos de acordo com o desenvolvimento das plantas. Durante a primeira fase de aclimação, as mudas foram avaliadas semanalmente com relação à biometria (MARQUES, et al., 2014b). No fim dessa etapa, foi realizado a primeira poda foliar com tesoura devidamente desinfestada em álcool 70%, esse manejo estimulou o desenvolvimento radicular e minimizou as perdas de água.

FIGURA 10: (a) Casa de Vegetação; (b) Mudas pré-brotadas sendo aclimatadas.



(a) Fonte: O autor.

(b) Fonte: O autor.

5.8 Aclimação - Fase 2

É a etapa final do processo de mudas pré-brotadas, essa fase ocorreu em uma bancada a pleno sol (Figura 11b), onde o objetivo principal foi adaptar as mudas às condições de plantio no campo. O manejo de podas foliares foi intensificado, com três podas ao longo de vinte e um dias. Ao final de sessenta dias,

período do ciclo completo, as mudas já apresentavam condições fisiológicas de serem retiradas dos copos e serem transportadas para o plantio no campo.

FIGURA 11: (a) Mudanças com excelente vigor; (b) Bancada a pleno sol com as mudas.



(a) Fonte: O autor.

(b) Fonte: O autor.

5.9 Análises de crescimento

No final do período de avaliação, as mudas pré-brotadas foram removidas dos copos plásticos, lavadas com água corrente para retirada do substrato, e submetidas à avaliação dos parâmetros biométricos de crescimento. Os procedimentos analíticos envolverão a mensuração e avaliação quantitativa dos seguintes parâmetros: massa fresca das raízes, massa seca das raízes, massa fresca da parte aérea, massa seca da parte aérea, porcentagem de sobrevivência (contando o número de sobreviventes e comparando com o total inicial), quantidade de perfilhos dentro do tubete, para cada um dos tratamentos (MARQUES et al., 2014a).

5.10 Avaliação da eficiência quântica do fotossistema II (F_v/F_m) e do Teor de clorofila foliar via índice SPAD

Foi avaliado a eficiência quântica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) com o fluorômetro. Todas as medidas foram realizadas no período da manhã e início do período da tarde, entre às 11h00min e as 13h00min, sempre em dias sem nuvens.

As características de fluorescência foram medidas em folhas intactas usando um fluorômetro modelo (PAR-FluorPen FP 100-MAX-LM), que é usado para estimar o grau de fotoinibição induzida pela seca.

Para a realização das leituras foi utilizada a quarta folha expandida de cada muda pré-brotada. Os parâmetros fisiológicos foram medidos três vezes durante o presente estudo, aos 30, 45 e 60 dias do início dos tratamentos com o polímero hidrorretentor.

Durante cada data de medição, quatro mudas foram adaptadas à sombra durante 30 minutos, utilizando grampos de folha antes das medições de fluorescência (Figura 12). O parâmetro relação F_v/F_m foi determinado seguindo os procedimentos de Maxwell e Johnson (2000), e usados para quantificar o grau de fotoinibição induzido pela seca.

FIGURA 12: Mudas adaptadas à sombra para análise de fluorescência.



Fonte: O autor.

O Índice SPAD foi medido usando-se um clorofilômetro SPAD-502 (Minolta Corp., Ramsey, NJ, EUA) e usando-se a média de três leituras na folha +1.

O índice SPAD corresponde à quantidade de clorofila na folha, porém é uma medida indireta, pois mede a intensidade de cor verde, que é correlacionada com o teor de clorofila. O teor de clorofila foliar foi estimado de forma não destrutivo, registrou-se a média de quatro medições efetuadas em três pontos distintos da mesma folha, nas cinco dosagens de tratamento com o polímero hidrorretentor.

5.11 Procedimentos estatísticos

Foi considerado o Delineamento Fatorial, com cinco tratamentos, dosagens do polímero hidrorretentor - (Fator A), três cultivares - (Fator B) com cinco repetições (mudas em copos), sendo as médias comparadas pelo Teste Scott-Knott ($\alpha = 0,05$). Também foi aplicada a análise de regressão ($\alpha = 0,05$) a fim de verificar a dosagem ideal do polímero para cada parâmetro (BANZATTO; KRONKA, 1992).

5.12 Obtenção de explantes e Indução de calogênese

Depois de realizado todos os procedimentos analíticos citados anteriormente nas mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar, foram selecionados vinte mudas de cada um dos três genótipos estudados e levados 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 cultivar foi representado por 20 colmos, 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 dentro da câmara de fluxo laminar durante todos os procedimentos de remoção e inoculação dos explantes (Figura 13).

FIGURA 13: Vidrarias esterilizadas e ponteiros das (MPB) imersos em água destilada, prontos para a remoção dos meristemas.



Fonte: O autor.

Após esse procedimento, os palmitos já 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 (Figura 14). Feito isso, os discos foram retirados do ácido cítrico e colocados em papel de filtro para retirada do excesso de solução. Assim, os discos foram inoculados em frascos de vidro autoclavadas contendo 30 mL de meio de cultura.

FIGURA 14: Vista do processo de corte dos discos meristemáticos e retirada do excesso de solução de ácido cítrico em papel de filtro.



Fonte: O autor.

Os discos foram inoculados em meio de cultura, esterilizado e de composição específica e 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 15).

FIGURA 15: Discos meristemáticos logo após a inoculação em meio de cultura para a formação de culturas celulares.



Fonte: O autor.

Os discos meristemáticos foram mantidos no escuro por 15 dias, a uma temperatura de aproximadamente 25°C, após esse período, houve o crescimento de calos embriogênicos (Figura 16), em seguida foram individualizados cada calo em um frasco diferente, para a manutenção dos mesmos.

FIGURA 16: Culturas celulares exibindo pronunciado crescimento e uma estrutura friável.



Fonte: O autor.

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 $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, sendo 20 frascos de cada cultivar avaliado, contendo uma cultura celular em cada. Após 30 dias, as culturas celulares foram passadas para meio MS (Tabela 2) e continuaram na presença de luz. Passado dez dias, haviam plântulas regeneradas (Figura 17).

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 microrganismo, passando-os que estavam livres de contaminação para outro vidro e os que estavam em contato com a contaminação foram descartados.

FIGURA 17: Multiplicação *in vitro* de plântulas cana-de-açúcar a partir de mudas pré-brotadas (MPB).



Fonte: O autor.

5.13 Composição do meio de cultura utilizado

Os três cultivares empregados nesta pesquisa CTC 9002; IAC 91-1099 e o IACSP 95-5000 foram avaliados em relação à formação de culturas celulares e crescimento durante o cultivo em meio contendo a solução salina do meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962). A composição deste meio é apresentada na tabela 2. O meio de cultura foi solidificado com Agar (9g/L), e teve o seu potencial hidrogeniônio ajustado previamente à adição de Agar, para valor de pH 6,3, para que resultasse em pH 5.8 após a autoclavagem a 1 atmosfera por 20 minutos. O meio foi preparado com no máximo 10 dias de antecedência e armazenado em sala climatizada com temperatura de 25°C , protegidos da luz.

TABELA 2: 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
Sacarose - C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	30.000,0

Fonte: EMBRAPA, 2011.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Utilizando o teste F estatístico (Tabela 1), demonstrou que as variáveis “diâmetro”, “número de folhas” e “massas frescas” e “massas secas”, das raízes não apresentaram alterações que pudessem ser explicadas pelo fator tratamento (doses de polímero adicionadas no substrato). As demais variáveis analisadas (“altura das mudas”, “massas frescas” e “massas secas”, da parte aérea, “índice de clorofila” aos 30, 45 e 60 dias após os tratamentos (DAT) e a “eficiência quântica” do fotossistema II, (F_v/F_m) “fluorescência” aos 30, 45 e 60 dias após os tratamentos (DAT), foram alteradas significativamente com as doses de polímero adicionadas no substrato.

Com relação ao fator cultivar, pode ser analisado (Tabela 1) que cultivares diferentes na produção de muda também proporcionaram alterações significativas nas mesmas variáveis, e também na variável “diâmetro médio do colmo”, demonstrando que estas variáveis possuem uma relação de interdependência dos atributos genéticos das plantas. Algumas variáveis como: (“massa fresca” da parte aérea, “índice de clorofila” (30, 45 e 60 dias) e “fluorescência”) apresentaram-se dependentes da interação dos dois fatores (doses de polímero e cultivar).

Estes resultados corroboram a hipótese de que a utilização de polímeros hidroabsorventes possa interferir (positivamente) na produção de MPB, tanto na redução do tempo, bem como evitando perdas de mudas por restrição hídrica e diminuição da capacidade fotossintética e de crescimento, como relatado por Nimah, Ryan e Chaudhry (1983) e Wang e Booger (1987), melhorando o rendimento de lavouras agrícolas, neste caso as mudas também podem colaborar com esta elevação do rendimento quando apresentar uma melhor conformação estrutural e maior velocidade de produção, fato que pode acarretar reduções de custos e reduções de impactos ambientais, tanto na produção como nas fases seguintes de produção.

TABELA 3: Análise de Variância para as variáveis estudada (F), sendo: (NS) = Não Significativo a 5%; (*) = Significativo a 5% e (**) = Significativo a 1%.

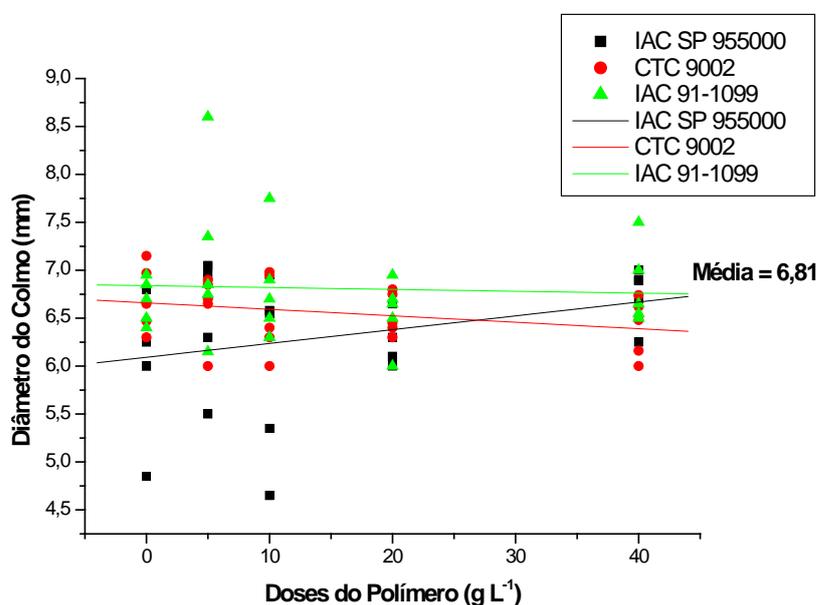
	ALTURA (cm)	DIÂMETRO (mm)	N° DE FOLHAS	PARTE AÉREA		RAÍZES		ÍNDICE CLOROF. 30 DIAS	ÍNDICE CLOROF. 45 DIAS	ÍNDICE CLOROF. 60 DIAS	MÉDIA GERAL FUORESC.
				M. F.	M. S.	M. F.	M. S.				
CULT.	**	**	NS	**	**	NS	NS	**	**	**	**
TRAT.	**	NS	NS	**	**	NS	NS	**	**	**	**
CULT. X TRAT.	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS	**	**	**	**

Na Tabela 4 e Gráfico 1 pode ser observado que dependendo que a utilização de polímero eliminou as diferenças entre os cultivares, para a variável diâmetro do colmo (Tabela 4) e que alguns cultivares foram afetados positivamente (IACSP 955000), sendo que outras afetadas negativamente (CTC 9002 e IAC 91 1019). Desta forma, o comportamento resultante da adição de polímeros pode ser considerado positivo, no entanto as doses recomendadas devem levar em consideração os cultivares que serão produzidos, e portanto, para cada cultivar comercial existente deve-se estudar tais comportamentos.

TABELA 4: Resultados estatísticos para variável Diâmetro do Colmo (mm), nos cultivares e tratamentos utilizados.

DOSE	DIÂMETRO DO COLMO			
	IAC 911099	IAC SP 955000	CTC 9002	MÉDIA
0	6,68 Aa	5,98 Ab	6,71 Aa	6,46 A
5	7,14 Aa	6,57 Aa	6,62 Aa	6,78 A
10	6,83 Aa	6,02 Aa	6,53 Aa	6,46 A
20	6,56 Aa	6,23 Aa	6,54 Aa	6,44 A
40	6,84 Aa	6,75 Aa	6,40 Aa	6,66 A
MÉDIA	6,81 a	6,31 b	6,56 b	
C.V. (%)	8,03			

Letras maiúsculas diferença na coluna e letras minúsculas diferença na linha ($p < 0,05$), para teste de contraste entre médias Scott-Knott.

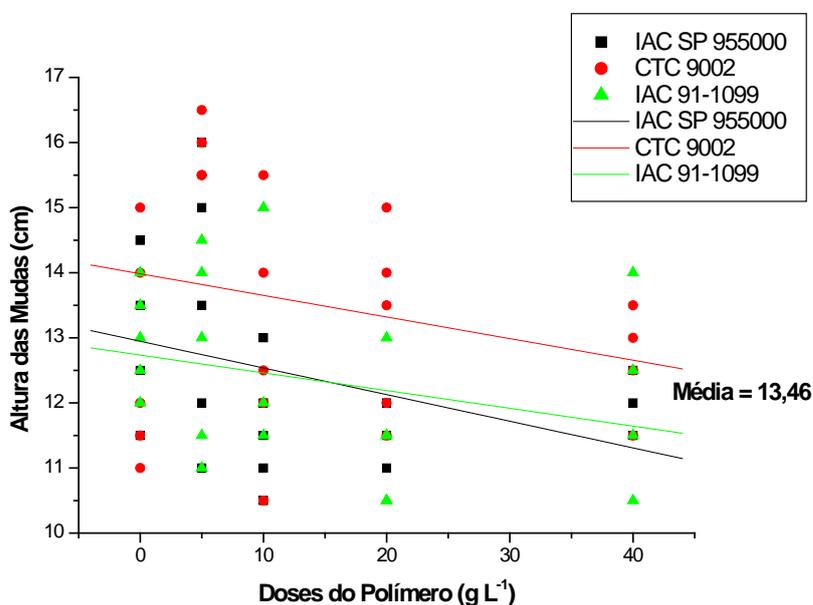


Para a variável “Altura das Mudas”, de grande importância para o estabelecimento da finalização das fases de produção de MPB, (Tabela 5), tem-se que em média a dose de 5 g L⁻¹ foi a única que apresentou valores melhores que a ausência do uso de polímero. No entanto o desdobramento deste estudo para o fator cultivar, apresenta diversidade de comportamento, apresentando também uma interdependência do cultivar submetido aos tratamentos. Também se observa no gráfico que o aumento das doses de polímero levou a reduções aos valores a variável estudada, esta informação traz a preocupação de ser encontrada a dose que realmente possa proporcionar os melhores desempenho. A dose de 5 g L⁻¹, neste estudo pode ser considerada a melhor, no entanto, entre 5 g L⁻¹ e 10 g L⁻¹ não se tem informações.

TABELA 5: Resultados estatísticos para variável Altura das Mudas (cm), nos cultivares e tratamentos utilizados.

DOSE	ALTURA DAS MUDAS			
	IAC 911099	IAC SP 955000	CTC 9002	MÉDIA
0	13,00 Aa	13,30 Aa	12,70 Ba	13,00 B
5	12,80 Ab	13,50 Ab	16,00 Aa	14,10 A
10	12,40 Aa	11,60 Ba	12,90 Ba	12,30 B
20	11,40 Ab	11,50 Bb	13,20 Ba	12,03 B
40	11,90 Aa	11,86 Ba	12,50 Ba	12,09 B
MÉDIA	12,30 b	12,35 b	13,46 a	
C.V. (%)	10,16			

Letras maiúsculas diferença na coluna e letras minúsculas diferença na linha ($p < 0,05$), para teste de contraste entre médias Scott-Knott.



Para a massa fresca da parte aérea, representada pela (Tabela 6), pode-se perceber que a dose de 5 g L⁻¹ foi a que apresentou melhores valores, sendo de resposta negativa, com o aumento da dose ocorreu diminuição de massa fresca, estes valores se repetiram para a massa seca (Tabela 7). Estes resultados indicam que as maiores doses promoveram um menor acúmulo de massa, sendo portanto desinteressante.

TABELA 6: Resultados estatísticos para variável Massa Fresca da Parte Aérea (g), nos cultivares e tratamentos utilizados.

DOSE	MASSA FRESCA DA PARTE AÉREA			MÉDIA
	IAC 911099	IAC SP 955000	CTC 9002	
0	11,96 Ba	8,59 Ab	6,05 Cc	8,86 B
5	14,57 Aa	8,79 Ab	13,10 Aa	12,15 A
10	11,35 Ba	6,16 Bb	7,93 Cb	8,48 B
20	8,84 Ca	7,92 Aa	9,73 Ba	8,83 B
40	10,93 Ba	9,05 Ab	7,51 Cb	9,16 B
MÉDIA	11,53 a	8,10 b	8,86 b	
C.V. (%)	18,19			

Letras maiúsculas diferença na coluna e letras minúsculas diferença na linha ($p < 0,05$), para teste de contraste entre médias Scott-Knott.

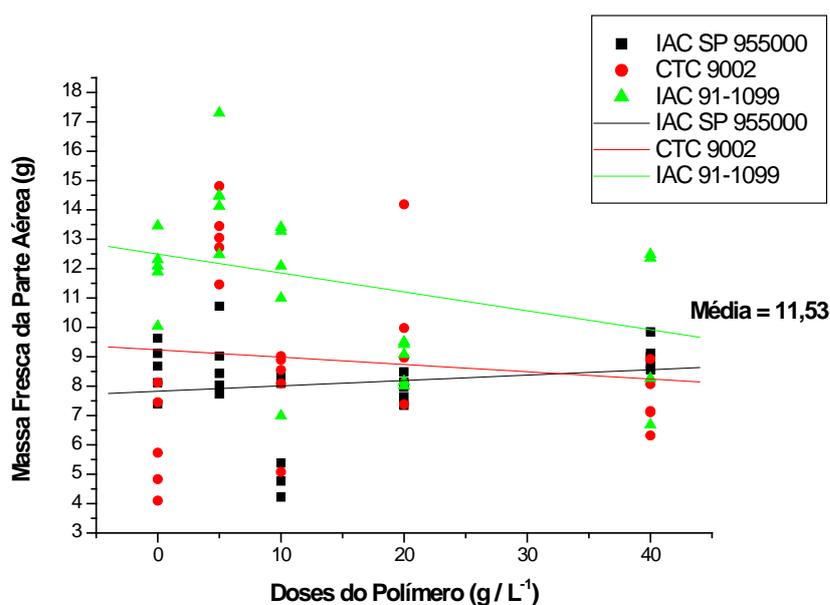
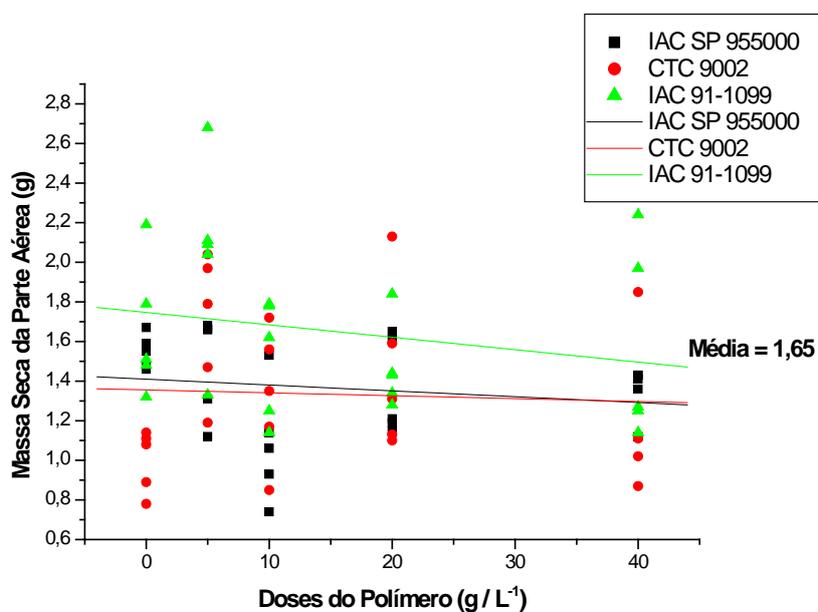


TABELA 7: Resultados estatísticos para variável Massa Seca da Parte Aérea (g), nos cultivares e tratamentos utilizados.

DOSE	MASSA SECA DA PARTE AÉREA			
	IAC 911099	IAC SP 955000	CTC 9002	MÉDIA
0	1,66 Ba	1,55 Aa	1,00 Bb	1,40 B
5	2,05 Aa	1,49 Ab	1,69 Ab	1,74 A
10	1,52 Ba	1,08 Aa	1,33 Ba	1,31 B
20	1,47 Ba	1,36 Aa	1,45 Aa	1,43 B
40	1,57 Ba	1,35 Aa	1,19 Ba	1,37 B
MÉDIA	1,65 a	1,36 b	1,33 b	
C.V. (%)	22,26			

Letras maiúsculas diferença na coluna e letras minúsculas diferença na linha ($p < 0,05$), para teste de contraste entre médias Scott-Knott.



Nas tabelas 8, 9 e 10, as médias da Eficiência Quântica do Fotossistema II (F_v/F_m) observadas durante todo o período do experimento com as doses do polímero utilizados, não foram menores que 0,701, valor que se encontra entre 0,70 e 0,85, intervalo que Silva et al. (2014) descrevem como sendo de plantas que estão com o aparelho fotossintético sem danos. Esse comportamento provavelmente ocorreu devido às condições de temperatura e luminosidade nos dias da avaliação.

TABELA 8: Resultados estatísticos para variável Eficiência Quântica do Fotossistema II (F_v/F_m) aos 30 dias após os tratamentos (DAT), nos cultivares e tratamentos utilizados.

DOSE	Eficiência Quântica do Fotossistema II (F_v/F_m) aos 30 (DAT)			
	IAC 911099	IAC SP 955000	CTC 9002	MÉDIA
0	0,71 Ca	0,71 Ca	0,70 Ba	0,71 C
5	0,69 Cb	0,82 Aa	0,81 Aa	0,78 B
10	0,70 Cb	0,79 Ba	0,80 Aa	0,77 B
20	0,75 Bb	0,79 Ba	0,80 Aa	0,78 B
40	0,82 Aa	0,78 Bb	0,81 Aa	0,80 A
MÉDIA	0,73 b	0,78 a	0,79 a	
C.V. (%)	3			

Letras maiúsculas diferença na coluna e letras minúsculas diferença na linha ($p < 0,05$), para teste de contraste entre médias Scott-Knott.

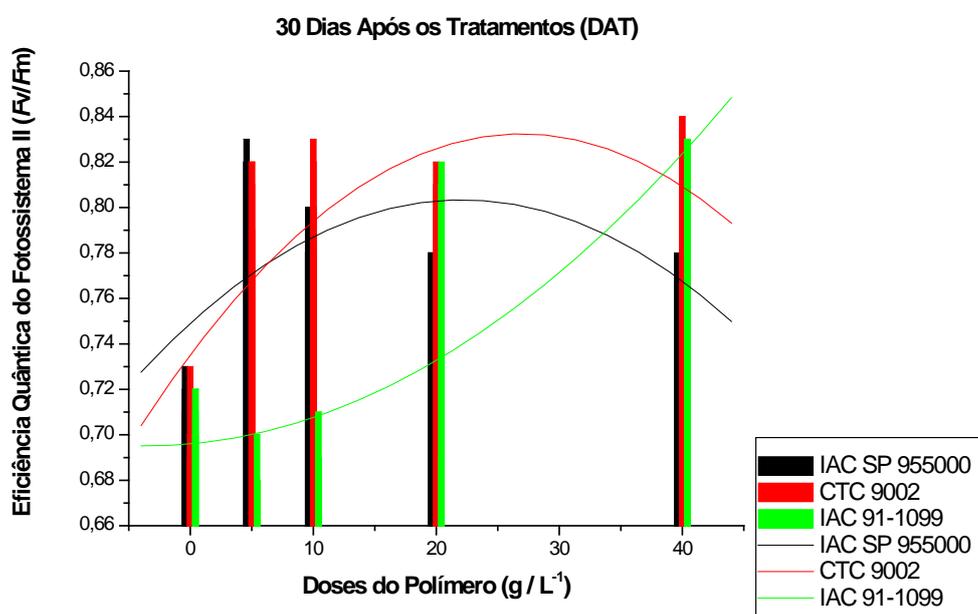


TABELA 9: Resultados estatísticos para variável Eficiência Quântica do Fotossistema II (F_v/F_m) aos 45 dias após os tratamentos (DAT), nos cultivares e tratamentos utilizados.

DOSE	Eficiência Quântica do Fotossistema II (F_v/F_m) aos 45 (DAT)			
	IAC 911099	IAC SP 955000	CTC 9002	MÉDIA
0	0,72 Cb	0,77 Aa	0,79 Aa	0,75 B
5	0,74 Cb	0,78 Aa	0,78 Aa	0,77 B
10	0,80 Ba	0,77 Ab	0,78 Ab	0,78 A
20	0,84 Aa	0,74 Bc	0,77 Ab	0,79 A
40	0,84 Aa	0,74 Bc	0,77 Ab	0,79 A
MÉDIA	0,80 a	0,75 c	0,78 b	
C.V. (%)	1,96			

Letras maiúsculas diferença na coluna e letras minúsculas diferença na linha ($p < 0,05$), para teste de contraste entre médias Scott-Knott.

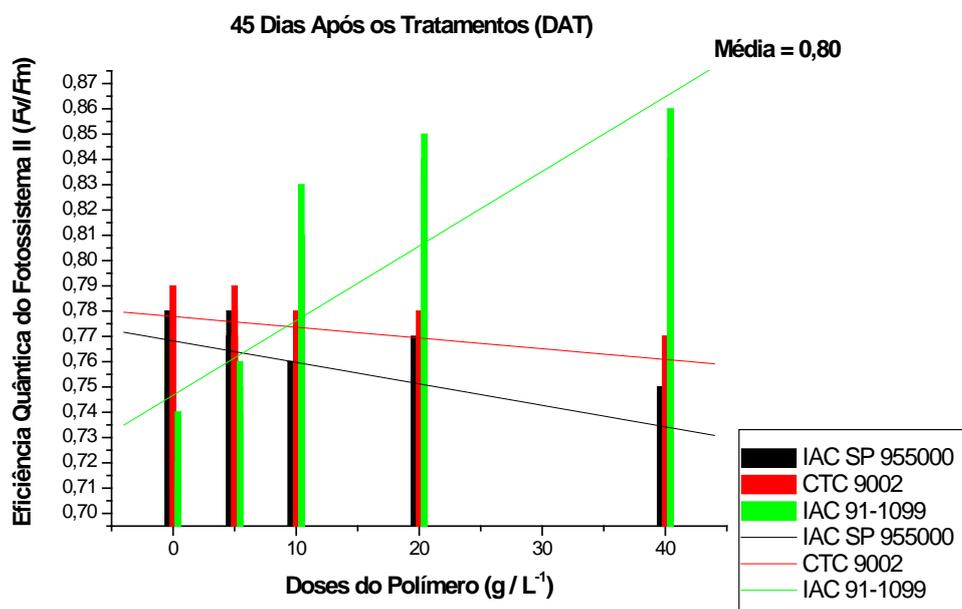
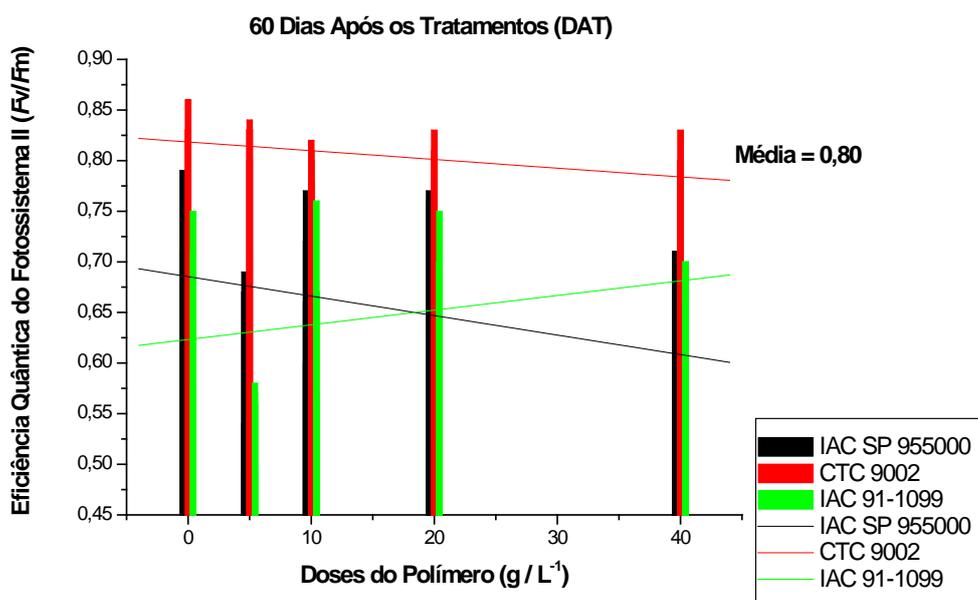


TABELA 10: Resultados estatísticos para variável Eficiência Quântica do Fotossistema II (F_v/F_m) aos 60 dias após os tratamentos (DAT), nos cultivares e tratamentos utilizados.

DOSE	Eficiência Quântica do Fotossistema II (F_v/F_m) aos 60 (DAT)			
	IAC 911099	IAC SP 955000	CTC 9002	MÉDIA
0	0,70 Ab	0,74 Ab	0,83 Aa	0,76 A
5	0,55 Ab	0,60 Ab	0,82 Aa	0,66 A
10	0,62 Ab	0,69 Ab	0,80 Aa	0,70 A
20	0,67 Aa	0,64 Aa	0,76 Aa	0,69 A
40	0,69 Ab	0,62 Ab	0,80 Aa	0,70 A
MÉDIA	0,64 b	0,66 b	0,80 a	
C.V. (%)	11,29			

Letras maiúsculas diferença na coluna e letras minúsculas diferença na linha ($p < 0,05$), para teste de contraste entre médias Scott-Knott.



As médias descritas na tabelas 11, 12 e 13, são resultados que estão de acordo com Silva et al. (2012) que constataram valores inferiores a 40 de índice SPAD em genótipos de cana-de-açúcar. Para Silva et al. (2007) leituras inferiores a 40 de índice SPAD indicam o início da deficiência de clorofila em cultivares de cana-de-açúcar, o que afeta o processo fotossintético. De acordo com Silva et al. (2012), esse parâmetro é considerado um bom indicador de distúrbios causados nas plantas para seleção de genótipos tolerante a seca.

TABELA 11: Resultados estatísticos para variável Índice de Clorofila aos 30 dias após os tratamentos (DAT), nos cultivares e tratamentos utilizados.

DOSE	ÍNDICE DE CLOROFILA AOS 30 (DAT)			
	IAC 911099	IAC SP 955000	CTC 9002	MÉDIA
0	15,33 Aa	14,12 Aa	14,62 Ba	14,69 C
5	24,77 Aa	16,03 Ab	19,17 Bb	19,99 B
10	19,27 Ab	15,16 Ab	35,63 Aa	23,35 A
20	20,48 Aa	16,27 Aa	19,02 Ba	18,60 B
40	19,40 Aa	14,81 Aa	14,13 Ba	16,11 C
MÉDIA	19,85 a	15,28 b	20,51 a	
C.V. (%)	40,09			

Letras maiúsculas diferença na coluna e letras minúsculas diferença na linha ($p < 0,05$), para teste de contraste entre médias Scott-Knott.

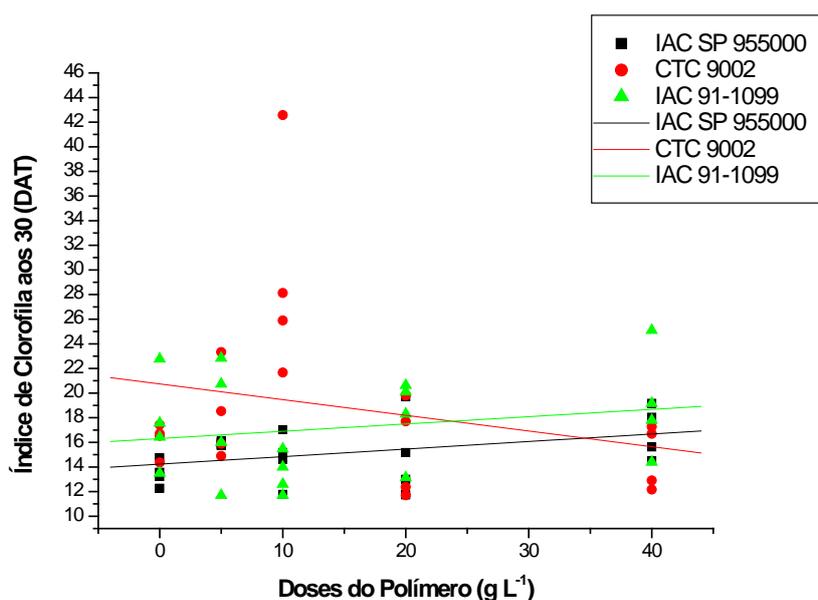


TABELA 12: Resultados estatísticos para variável Índice de Clorofila aos 45 dias após os tratamentos (DAT), nos cultivares e tratamentos utilizados.

DOSE	ÍNDICE DE CLOROFILA AOS 45 (DAT)			
	IAC 911099	IAC SP 955000	CTC 9002	MÉDIA
0	17,34 Aa	15,30 Aa	16,60 Ca	16,41 B
5	25,53 Aa	20,19 Aa	24,78 Ba	23,50 A
10	20,50 Ab	19,57 Ab	32,82 Aa	24,30 A
20	21,16 Aa	18,07 Aa	20,82 Ca	20,01 B
40	23,56 Aa	17,12 Ab	14,84 Cb	18,50 B
MÉDIA	21,62 a	18,05 b	21,97 a	
C.V. (%)	35,75			

Letras maiúsculas diferença na coluna e letras minúsculas diferença na linha ($p < 0,05$), para teste de contraste entre médias Scott-Knott.

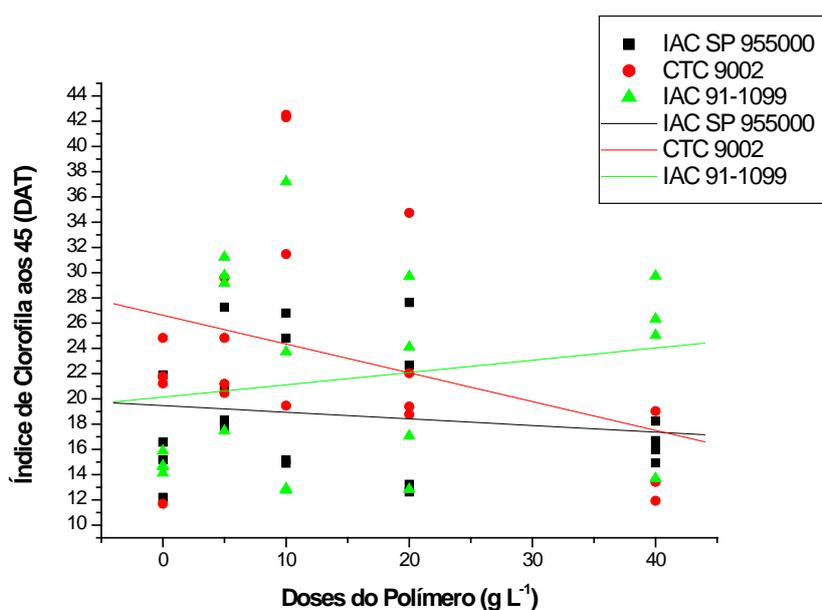
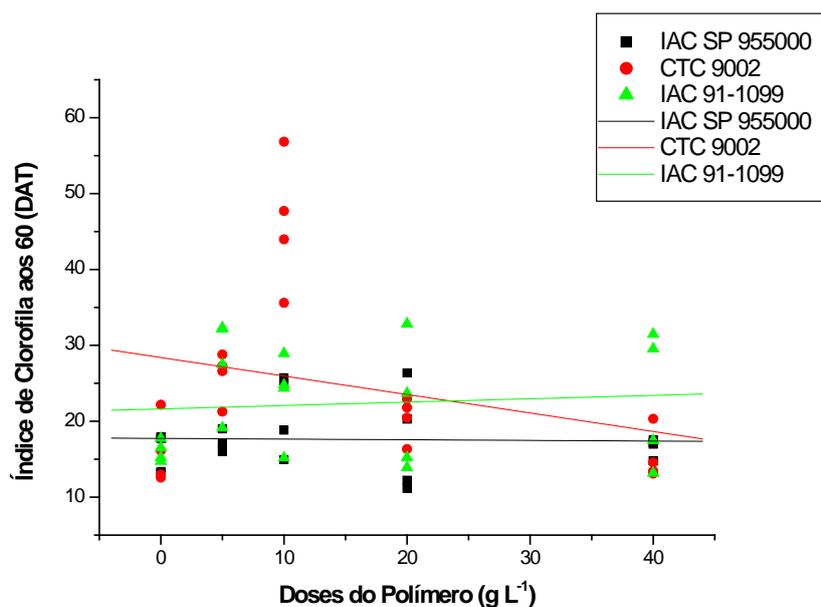


TABELA 13: Resultados estatísticos para variável Índice de Clorofila aos 60 dias após os tratamentos (DAT), nos cultivares e tratamentos utilizados.

DOSE	ÍNDICE DE CLOROFILA AOS 60 (DAT)			
	IAC 911099	IAC SP 955000	CTC 9002	MÉDIA
0	15,78 Aa	16,04 Aa	20,88 Ba	17,57 B
5	22,21 Aa	17,99 Aa	24,23 Ba	21,48 B
10	18,63 Ab	21,44 Ab	41,07 Aa	27,05 A
20	18,74 Aa	17,11 Aa	19,67 Ba	18,50 B
40	22,77 Aa	17,98 Ab	15,61 Bb	18,79 B
MÉDIA	19,63 b	18,11 b	24,29 a	
C.V. (%)	35,26			

Letras maiúsculas diferença na coluna e letras minúsculas diferença na linha ($p < 0,05$), para teste de contraste entre médias Scott-Knott.



No 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 18).

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.

FIGURA 18: Desenvolvimento de sistema de produção rápida de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar, a partir de MPB.



Fonte: O autor.

7 CONCLUSÕES

- Pelos parâmetros biométricos e fisiológicos analisados, tem-se grande potencial na utilização de polímero hidrorretentor para o crescimento mais rápido com economia de água;
- A metodologia de cultivo *in vitro* de meristemas, apresentou resultados fantásticos, portanto a utilização desta tecnologia pode ser preconizada em produção de MPB;
- Existe uma relação entre a carga genética (cultivar) nas variáveis biométricas e fisiológicas, no crescimento das mudas de MPB;
- Novos experimentos, que acompanhem até a colheita do material produzido devem ser realizados para aferir se ocorrem aumentos de produtividades, os quais poderiam levar as reduções de áreas de cultivos e conseqüentemente redução de impactos ambientais;
- A criação de biofábricas por pequenos produtores ou assentados é totalmente possível, demandando políticas públicas e sensibilização de empresários do setor, através de incentivos fiscais e legislações específicas.

REFERÊNCIAS

- AMARANTE, C. V. T. et al. Quantificação de clorofilas em folhas de milho através de métodos ópticos não destrutivos. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 9, n. 1, p. 39-50, 2010.
- ARGENTA, G. et al. Relação da leitura do clorofilômetro com os teores de clorofila extraível na folha de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 13, p. 158-167, 2001.
- ARUNYANARK, A. et al. Stability of relationship between chlorophyll density and soil plant analysis development chlorophyll meter readings in peanut across different drought stress conditions. **Asian Journal of Plant Science**, Nova York, v. 8, n. 2, p. 102-110, 2009.
- ASH, C. et al. Feeding the future. **Science**, v.327, p.797, 2010.
- AZZAM, R. A. I. Polymeric conditioner gels for desert soils. **Communication Soil Science Plant**, v. 14, p. 739-760, 1983.
- AZEVEDO, T. L. F. **Avaliação da eficiência do polímero agrícola de poliácridamida no fornecimento de água para o cafeeiro (*Coffea arabica* L.) cv. Tupi**. 2000. 38f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá - UEM, Maringá, 2000.
- AZEVEDO, T. L.; BERTONHA, A.; GONÇALVES, A. C. A. Uso de hidrogel na agricultura. **Revista do Programa de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, v.1, p.23-31, 2002.
- BAKER, N. R.; EAST, T. M.; LONG, S. P. Chilling damage to photosynthesis in young Zea Mays. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 139-189, 1983.
- BARBIERI, V.; BACCHI, O. O. S.; VILLA NOVA, N. A. Análise do fator temperatura do ar no desenvolvimento vegetativo da cana-de-açúcar (*Saccharum spp*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROMETEOROLOGIA, 1979, Mossoró. **Anais...**: Mossoró: Sociedade Brasileira de Agrometeorologia, 1979. p. 6-8.
- BARBIERI, V. **Medidas e estimativas de consumo hídrico em cana-de-açúcar (*Saccharum spp*)**. 1981. 82p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1981.
- BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. do N. **Experimentação agrícola**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 1992.
- BEAUCLAIR, E. G. F.; SCARPARI, M. S. **Plantio de cana-de-açúcar: estado da arte**. Piracicaba: T. C. C. Ripoli, 2007. p. 65-73.

BEER, L. L. et al. Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. **Current Opinion in Biotechnology**, v.20, n.3, p.264-71, 2009.

BERNARDES, M. S. Fotossíntese no dossel das plantas cultivadas. In: CASTRO, P. R. C. **Ecofisiologia da produção agrícola**. Piracicaba: POTAFOS, 1987. p. 13-48.

BERNARDI, M. R. et al. Crescimento de mudas de *Corymbia citriodora* em função do uso de hidrogel e adubação. **Cerne**, Lavras, v.18, n.1, p.67-74, jan./mar. 2012.

BORTHAKUR, M.; HAZARIKA, J.; SINGH, R. S. A protocol for micropropagation of *Alpinia galanga*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v.55, n.3, p.231-233, 1999.

BOULAY, M. Aspects pratiques de la multiplication in vitro des essences forestiers. **Annales de Recherches Sylvicoles AFOCEL**, v.21, p.61-78, 1984.

BRAGION, L. O Proálcool Renasce. **Com Ciência, Revista Eletrônica de Jornalismo Científico**. 2013. Disponível em: <<http://comciencia.br/comciencia/?section=8&edicao=23&id=254&tipo=0>>. Acesso em: 15 mar. 2015.

BUITELAAR, R. M.; 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.

CAMARA, G. R. et al. Avaliação do desenvolvimento do cafeeiro conilon robusta tropical mediante uso de polímeros hidrorretentores e diferentes turnos de rega. **Enciclopédia Biosfera**, v.7, n.13, p.135-141, 2011.

CAMPOSTRINI, E. **Fluorescência da clorofila a: considerações teóricas e aplicações práticas**. Rio de Janeiro, 1997. Disponível em: <http://www.uenf.br/Uenf/Downloads/CENTRO_CCTA_1629_1112121492.pdf>. Acesso em: 01 ago. 2017.

CASAGRANDE, A. A. **Tópicos de morfologia e fisiologia da cana-de-açúcar**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. 157p.

COLETI, J. T.; STUPIELLO, J. J. Plantio da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S. V. et al. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: CP 2, 2006. cap. 10, p. 139-153.

CONAB. **Levantamentos de Safra: segundo levantamento agosto 2016/17**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 01 dez. 2016.

CORTÉS, A. B. et al. Evaluación de hidrogeles para aplicaciones agroforestales. **Revista Ingeniería e Investigación**, Bogotá, v.27, n.3, p.35-44, 2007.

COSTA LIMA, M.A. et al. 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.; MISAWA, M. Plant cell and tissue culture: alternative for metabolite production. **Biotechnology Advances**, v.13, p.425-453, 1995.

DODDS, J. H.; ROBERTS, L. W. **Experiments in plant tissue culture**. 3 ed. England: Cambridge University Press, 1995.

EMBRAPA. **Processo de cultura de tecidos**. 2011. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: fev. 2017.

FAO. **AQUASTAT** –. 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/nr/water/aquastat/main/index.stm>>. Acesso em: 10 jan. 2017.

FAUCONNIER, R.; BASSEREAU, D. **La caña de azúcar**. Barcelona: Blume, 1975.

FRANCLET, A. et al. Rejuvenation. In: BONGA, J. M.; DURZAN, J. (Ed). **Cell and tissue culture in forestry: general principles and biotechnology**. Dordrecht: MartinusNijhoff, 1987.

FONTSERÉ, J. M. Qué son los polímeros hidroabsorventes agrícolas? **Revista da Industria Horticola**. Ed. Outubro, 2003. p. 172.

GÁBORCÍK, N. Relationship between contents of Chlorophyll (*a+b*) (SPAD values) and nitrogen of some temperature grasses. **Photosynthetica**, Slovakia, v. 41, n. 2, p. 285-287, 2003.

GAJ, M. D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.43, n.1, p. 27-47, 2004.

GASCHO, G. J.; SHIH, S. F. Sugarcane. In: TEARE, I.D.; PEET, M.M. (Eds.). **Crop-water relations**. New York: Wiley-Interscience, 1983. p. 445-479.

GERVÁZIO, E. S.; FRIZZONE, J. A., Caracterização físico-hídrica de um condicionador de solos e seus efeitos quando misturado a um substrato orgânico. **Revista Irriga**, v. 9, n. 2, p. 95-105, 2004.

GONÇALVES, E. R. **Fotossíntese, osmorregulação e crescimento inicial de quatro variedades de cana-de-açúcar submetida à deficiência hídrica**. 2008. 66 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Produção Vegetal)-Universidade Federal do Alagoas, Rio Largo.

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 / CNPH, 1998. v.1, p.183-260.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Apostila de biotecnologia 1: cultura de tecidos vegetal**. Florianópolis: CCA/UFSC, 2006.

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS. **Fatos históricos relacionados ao desenvolvimento da cultura da cana-de-açúcar até o fim do século XX.**

Campinas: IAC, 2012, p. 12-13, 2012. (Instituto Agronômico, doc. n.109).

JABEEN, F.; SHAHBAZ, M.; ASHRAF, M. Discriminating some prospective cultivars of maize (*Zea mays* L.) for drought tolerance using gas exchange characteristics and proline contents as physiological markers. **Pakistan Journal of Botany**, Islamabad, v. 40, n. 6, p. 2329-2343, 2008.

JAMES, G. **Sugarcane**. 2nd ed. Oxford: Blackwell, 2004.

JAMES, E. A.; RICHARDS, D. The influence of iron source on the water-holding properties of potting media amended with water-absorbing polymers. **Scientia Horticulturae**, v. 28, p. 201-208, 1986.

JANGPROMMA, N. et al. Rapid assessment of chlorophyll content in sugarcane using a spad chlorophyll meter across different water stress conditions. **Asian Journal of Plant Sciences**, Nova York, v. 9, n. 6, p. 368-374, 2010.

JOHNSON, M. S. Effect of soluble salts on water absorption by gel-forming soil conditioners. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 35, n. 10, p. 1063-1066, 1984.

KAMPF, A. N. Seleção de materiais para o uso como substrato. In: KAMPF, A. N.; FERMINO, M. H. **Substratos para plantas: a base da produção vegetal em recipientes**. Porto Alegre: Gênese, 1999. p. 139-145.

LANDELL, M. G. A. et al. **Sistema de multiplicação de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas**. Campinas: Instituto Agronômico, 2014.

LARCHER, W.; CERNUSCA, A. Mikrocomputergesteuerte mobile Anlage zum fluorometrischen Nachweis Von Photosynthesestörungen. **Bericht der Oesterreichische Akademie der Wissenschaften**, Vienna, v. 194, p. 45, 1985.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RIMA, 2000.

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.

LEE, T. S. G. Micropropagação de cana-de-açúcar através de cultura de meristema apical. **Saccharum APC**, v. 7, p. 36-39, 1984.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods of Enzymology**, Londres, v. 148, p. 350-382, 1987.

LIMA, L. M. L. et al. Produção de mudas de café sob diferentes lâminas de irrigação e doses de um polímero hidroabsorvente. **Bioscience Journal**, v.19, n.3, p.27-30, 2003.

MALHOTRA, S.D. Biotechnology and sugarcane. **International Sugar Journal**, v.97, p.160-163, 1995.

MARQUES, P. A. A.; CRIPA, M. A. M.; MARTINEZ, E. H. Hidrogel como substituto da irrigação complementar em viveiro telado de mudas de cafeeiro. **Ciência Rural**, v.43, n.1, p.1-7, 2013.

MARQUES, T. A. et al. How the components of bioenergy and technological traits are affected by water deficit in sugarcane. **Applied Research & Agrotechnology**, v.7, n.2, p.7-14, 2014a.

MARQUES, T. A. et al. Palhiço, polímero hidrogel e sistemas de plantio nos parâmetros de biometria, tecnologia, energia e produtividade de cana-de-açúcar. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.30, n.5, p.501-511, out. 2014b.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A. A. F.; ARIZONO, H. Melhoramento da cana-de-açúcar. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 2005. p. 225-274.

MAURI, R. **Relações hídricas na fase inicial de desenvolvimento da cana-de-açúcar submetida a déficit hídrico variável**. 2012. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

MAXWELL C.; JOHNSON, G. M. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, p. 659-668, 2000.

MELO, B. et al. Uso do polímero hidroabsorvente terracottem e da frequência de irrigação na produção de mudas de cafeeiros em tubetes. **Revista CERES (Brasil)**, Lavras, v. 52, n. 299, p. 13-22, 2005.

MINOLTA CAMERA. **Manual for chlorophyll meter SPAD 502**. Osaka, Minolta, Radiometric Instruments divisions. 1989.

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.

MOREIRA, R. A. et al. Efeito de doses de polímero hidroabsorvente no enraizamento de estacas de amoreira. **Agrarian**, v.3, n.8, p.133-139, 2011.

MOZAMBANI, A. E. et al. História e morfologia da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S. V. et al. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: CP, 2006. p. 21-42.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, v.25: p.135-166, 1974.

MURASHIGE, T.; 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.

NIMAH, N. M.; RYAN, J.; CHAUDHRY, M. A. Effect of synthetic conditioners on soil water retention, hydraulic conductivity, porosity, and aggregation. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 47, p. 742-745, 1983.

PAULA CIDADE, D.A. et al. Morfogênese in vitro de variedades brasileiras de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.3, p.385-391, mar. 2006.

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

RÊGO, G. M.; POSSAMAI, E. **Avaliação dos teores de clorofila no crescimento de mudas de Jequitibá-Rosa (*Cariniana legalis*)**. Colombo: EMBRAPA, 2004. (Comunicado Técnico, 128).

RODRIGUES, J. D. **Fisiologia da cana-de-açúcar**. [S.l.]: UNESP, Instituto de Biociências. 1995. 99 p. Disponível em: <<http://www.residenciaagronomica.ufpr.br/bibliografia/MATURAD.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2015.

RONG-HUA, L.I. et al. Evaluation of chlorophyll content and fluorescence parameters as indicators of drought tolerance in barley. **Agricultural Sciences in China**, Oxford, v. 5, n. 10, p. 551-557, 2006.

SANTIAGO, E. J. A. et al. **Multiplicação**: cultura de tecidos. Lavras: UFLA, 2001. p. 50-57.

SANTONI, N. et al. Caracterización de Hidrogeles de quitosano entrecruzados covalentemente con Genipina. **Iberoamericana de Polímeros**, v. 9, n. 3, p 326-330, 2008.

SEGATO, S. V.; MATTIUZ, C. F. M.; MOZAMBANI, A. E. Aspectos fenológicos da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S. V. et al. (Orgs.). **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: Ed. dos Autores, 2006. Cap. 2, p. 19-36.

SETZER, J. **Atlas climático e ecológico do Estado de São Paulo**. São Paulo: Comissão Interestadual da Bacia do Paraná – Uruguai; CESP, 1966. p. 35-39.

SHAINBERG, I.; LEVY, G. J. Organic polymers and soil sealing in cultivated soils. **Soil Science**, Baltimore, v. 158, n. 4, p. 267-273, 1994.

SILVA, M. A. et al. Use of physiological parameters to detect differences in drought tolerance among sugarcane genotypes. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS CONGRESS, 26., 2007, Durban. **Proceedings...** Durban: ISSCT, 2007. p. 541-547.

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

SILVA, M. de A. et al. Relationships between physiological traits and productivity of sugarcane in response to water deficit. **Journal of Agricultural Science**, v. 152, n. 1, p. 104-118, 2014. doi: 10.1017/S0021859612000834.

SMITH, D. M.; INMAN-BAMBER, N. G.; THORBURN, P. J. Growth and function of the sugarcane root system. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 92, p. 169-183, 2005.

SOARES, F.P. et al. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancorniaspeciosa* Gomes). **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1048-1053, jul./ago. 2007.

STREIT, N.M. et al. As clorofilas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 748-755, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Artmed, Porto Alegre, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Artmed, Porto Alegre, 2009.

TAKEDA, S.; MATSUOKA, M. Genetic approaches to crop improvement: responding to environmental and population changes. **Nature Reviews Genetics**, v.9, p.444-57, 2008.

TORRES NETTO, A. et al. Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 104, n. 2, p. 199-209, 2005.

UNESCO. **International Symposium on New Directions in Urban Water Management**. [S.I.]: Unesco, 2013.

VASCONCELOS, A. C. M.; CASAGRANDE, A. A. Fisiologia do sistema radicular. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A (Eds.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: IAC, 2010. p. 79-98.

VIEIRA, R.A. et al. Diferentes concentrações de 6- benzilaminopurina e cinetina na micropropagação *in vitro* das variedades RB867515 e RB855156 de cana-de-açúcar. **Campo Digital**, Campo Mourão, v.4, n.1, p. 122-126, jan/dez. 2009.

XU, W.; ROSENOW D.T.; NGUYEN, H.T. Stay green trait in grain sorghum: Relationship between visual rating and leaf chlorophyll concentration. **Plant Breeding**, Berlin, v. 119, n. 4, p. 365-367, 2000.

WANG, Y. T.; BOOGHER, C. A. Effect of a medium-incorporated hydrogel on plant growth and water use of two foliage species. **Journal of Environment Horticulture**, Washington, v. 5, n. 3, p. 125-127, 1987.

WALLACE, A.; WALLACE G. A.; ABOUZAMZAM, A. M. Amelioration of soil sodic with polymers. **Soil Science**, Batimore, v. 141, n. 5, p. 359-362, 1986.

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.