

ENSAIOS PRELIMINARES PARA A CLONAGEM *IN VITRO* DE ACESSOS DE CANA-DE-AÇÚCAR CULTIVADOS NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

PRELIMINARY ASSAYS TO *IN VITRO* CLONING OF SUGARCANE ACCESSIONS GROWING IN RIO GRANDE DO SUL STATE

Lia Rosane Rodrigues¹; Carolina Tessele²; Elisângela Aquino de Souza²; Wilson Caetano³.

RESUMO

Em uma etapa inicial para a estruturação de um sistema de produção de mudas sadias de cana-de-açúcar no Rio Grande do Sul, executou-se um trabalho com o objetivo de adaptar um protocolo de micropropagação para viabilizar a limpeza clonal dos acessos já avaliados comparativamente em rede pela FEPAGRO. Apesar de os meristemas terem sido gerados sob condições controladas, a proliferação de microorganismos no meio de indução foi a causa mais expressiva de perdas. Por isso, desenvolveu-se uma sequência de procedimentos para a geração de matrizes. Após a regeneração das primeiras vitroplantas, houve elevados índices de multiplicação, por meio da separação dos perfilhos em meio de cultivo sem fitorreguladores. O enraizamento ocorreu após quatro ou cinco subcultivos, dispensando fitorreguladores, e as plantas foram aclimatizadas com sucesso. O trabalho subsidiará iniciativas para o progresso tecnológico da cultura da cana-de-açúcar no Estado.

Palavras-chave: cana-de-açúcar, meristema, micropropagação, *Saccharum spp*

ABSTRACT

As a first step to structure a system to produce sugarcane healthy propagule in Rio Grande do Sul State, *in vitro* cultures were executed in order to adapt a micropropagation protocol of clone cleaning of the accessions until now comparatively evaluated in a field web of assays. Despite meristems were obtained under controlled conditions, contamination by microorganisms in the induction phase was the most significant cause of *in vitro* losses. Thus, it was proposed a sequence of procedure to prepare tissue donor plants. After regeneration of the first shoots, it was recorded high

multiplication rates by means of shoot division in the absence of growth regulators. *In vitro* rooting occurred after four to five subcultures, without growth regulators, and complete plants were acclimatized with success. The results will offer support to technical advances of sugarcane culture in Rio Grande do Sul State.

Key words: sugarcane, meristem, micropropagation, *Saccharum spp*

INTRODUÇÃO

A propagação e a manipulação *in vitro* da cana-de-açúcar apresentam grandioso avanço tecnológico nas regiões do planeta em que a cultura está mais desenvolvida, onde biofábricas (LEE et al., 2007) e sistemas automatizados (KAIZU et al., 2002) viabilizaram-se para a geração em larga escala de material propagativo sadio com origem genética assegurada.

Em contraste, no Estado do Rio Grande do Sul, as iniciativas para pesquisa e geração de tecnologias para a cultura da cana-de-açúcar ainda estão em uma condição inicial (GOMES e KICHEL, 1996; MALUF et al., 2008; SILVA et al., 2008), de modo que o Estado é grande importador de álcool combustível.

Nesse Estado, a cana-de-açúcar é cultivada desde 1725, em propriedades de economia familiar, para emprego forrageiro e produção artesanal de alimentos (SCHUCH, 2007), período em que tanto acessos antigos quanto material introduzido por viajantes foram propagados vegetativamente *in vivo*.

Apesar de viabilizar plantios de indivíduos idênticos a partir de um mesmo acesso ao longo de inúmeros ciclos de produção, a propagação vegetativa desencadeia problemas de origem genética e sanitária. Dentre os problemas de origem genética, destacam-se a perda ou troca da denominação original da variedade

¹ Eng. Agr. Dr. Pesquisador IV da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul (FEPAGRO). Rua Gonçalves Dias, 570, CEP 90130-060, Porto Alegre, RS. E-mail: lia-rodrigues@fepagro.rs.gov.br.

² Graduandas em Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

³ Eng. Agr. Pesquisador da FEPAGRO. E-mail: wilson-caetano@fepagro.rs.gov.br

(Recebido para Publicação em 25/03/2009, Aprovado em 20/05/2010)

e o acúmulo de alterações genéticas com a idade avançada do tecido de origem, como perdas teloméricas, mutações de ponto, sequências virais inativas e variações de número cromossômico. Dentre os problemas de origem sanitária, destacam-se o acúmulo de organismos patogênicos nos tecidos da muda (TORRES et al., 1999).

A renovação das variedades com bom desempenho produtivo e a apropriação, pela pesquisa pública, dos acessos historicamente adaptados aos ambientes do Estado são etapas essenciais para o desenvolvimento tecnológico da cultura da cana-de-açúcar.

Por isso, foi feito um trabalho com o objetivo de adaptar um protocolo de micropropagação para os acessos que estão sendo avaliados comparativamente em rede pela Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), como um primeiro passo para a estruturação de um sistema de produção de mudas sadias no Rio Grande do Sul.

MATERIAL E MÉTODOS

Em junho de 2008, foram coletados colmos dos acessos Ligeirona, Bento Gonçalves, RB765418 e RB851011, para um teste preliminar. Em agosto de 2008, foram coletados colmos de NA56-79, RB787750, SP71-1406 e SP70-1143 para um experimento *in vitro*. O material foi retirado de uma coleção de 218 acessos, mantida na Unidade de Viamão (RS) da FEPAGRO, com latitude 30°02'29" Sul, longitude 51°04'45" Oeste, altitude em torno de 112 m, com médias anuais de temperatura e precipitação de 19,9°C e 1314 mm, respectivamente. Em cada coleta, foram escolhidos quatro acessos com colmos vigorosos e homogêneos quanto à distância entre os nós.

No Laboratório de Cultura de Tecidos da FEPAGRO, em Porto Alegre, os colmos foram submetidos a: a) Remoção das folhas e fracionamento com serra desinfestada por imersão em etanol 70% para a individualização de toletes contendo um nó; b) Fricção com esponja e detergente líquido sob água corrente para remoção de poeira e fumagina; c) Imersão em etanol 70% por 1 min, e em NaOCl 1% por 10 min (teste preliminar), e por 40 min para o experimento *in vitro*; d) Enxágüe abundante em água corrente (teste preliminar) ou triplo enxágüe em água estéril (experimento *in vitro*) e cobertura com casca de arroz carbonizada esterilizada umedecida com água destilada estéril dentro de recipientes rasos (bandejas de alumínio); e) Manutenção dos toletes com os nós voltados para cima em estufa a 37±2°C no escuro para indução à brotação, com reposição da umidade do substrato a cada 48 ou 72 h.

Durante a brotação das gemas do material coletado em agosto, para o experimento *in vitro*, a umidade do substrato foi mantida com soluções dos produtos fitossanitários alternados: sulfato de cobre

com oxitetraciclina (Agrimaicin a 0,43 g L⁻¹), mancozeb (Manzate a 2g L⁻¹), tiofanato metílico (Cercobin a 0,75 g L⁻¹), dicarboximida (Captan a 2 g L⁻¹) e procimidona (Cialex a 1,5 g L⁻¹).

Em câmara de fluxo estéril, tanto para o teste preliminar quanto para o experimento *in vitro*, o meristema de cada brotação, medindo 2 a 3 mm, foi removido ao estereoscópio e estabelecido individualizadamente em tubo de ensaio (Ø =2,5 cm) contendo 10 mL de meio de indução MP II (LEE et al., 2007) contendo 0,1 mg cinetina, 0,2 mg 6-benziladenina e 20 g sacarose L⁻¹. O pH do meio foi corrigido para 5,8 previamente à autoclavagem.

No teste preliminar, os meristemas foram estabelecidos em diferentes condições de cultivo para identificar requerimentos especiais dos tecidos. Um total de 13 meristemas, sendo, no mínimo, um de cada acesso, foram estabelecidos em três variações do meio MP II (LEE et al., 2007): 1ª) com 7 g ágar L⁻¹, resfriado com inclinação ~30°; 2ª) com dupla fase (8 mL de meio com 7 g ágar L⁻¹ cobertos com 2 mL de meio líquido); 3ª) sem ágar (10 mL de meio líquido).

Para comparar o potencial morfogênico dos acessos NA56-79, SP71-1406, RB787750, SP70-1143, foram estabelecidos 43 meristemas em meio MP II (LEE et al., 2007) com pH 5,8, acrescido de 7 g ágar L⁻¹ e resfriado com inclinação ~30°. O delineamento foi completamente casualizado com 3 repetições para NA56-79 e 4 repetições para os demais acessos, sendo cada parcela constituída por 3 frascos.

Os explantes foram mantidos em sala climatizada (fotoperíodo de 16 h a 1600 lux, temperatura 27 ±1°C) e avaliados semanalmente quanto aos aspectos: a) resposta morfogênica [vivos (com e sem desenvolvimento) e mortos]; b) oxidação fenólica; c) contaminação (fúngica e bacteriana).

Após 28 dias *in vitro*, os meristemas que apresentaram resposta morfogênica, sem contaminação, foram transferidos para frascos *snap cap* contendo 30 a 33 mL do meio de multiplicação MP II (LEE et al., 2007) sem fitorreguladores, acrescido de 20 g sacarose e 7 g ágar L⁻¹. O pH do meio foi corrigido para 5,8 previamente à autoclavagem.

A etapa de multiplicação incluiu subcultivos em meio de multiplicação de igual constituição a cada 14 dias, por meio da separação dos perfilhos. A partir do terceiro subcultivo, foi testada a variação do meio de multiplicação, com transferência de parte do material para meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) sem fitorreguladores, contendo 30 g sacarose e 7 g ágar L⁻¹ e pH corrigido para 5,8 antes da autoclavagem.

Os dados registrados aos 21 dias do cultivo experimental foram submetidos aos testes de normalidade e de igualdade das variâncias. Os dados foram transformados e submetidos à análise de variância paramétrica e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan quando a probabilidade de o F calculado ser superior ao F tabelado foi ≤ 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os acessos responderam ao estímulo à brotação em estufa. No prazo de 21 a 28 dias, uma brotação aclorofilada foi emitida de cada nó, contendo o meristema apical caulinar a ser estabelecido *in vitro*. A emissão de raízes precedeu ou foi simultânea à brotação caulinar, variando conforme o acesso.

O teste preliminar permitiu a identificação das características morfológicas e da estratégia mais adequada

para excisão e estabelecimento dos meristemas. Todos os explantes desse cultivo foram perdidos pela competição com microorganismos que se proliferaram *in vitro*, o que comprovou a necessidade de medidas preventivas à contaminação no preparo dos tecidos.

No cultivo experimental *in vitro*, os dados apresentaram distribuição normal e igualdade das variâncias, bem como coeficientes de variação aceitáveis (de 9 a 28%) para todas as variáveis analisadas. Houve diferença significativa entre os acessos apenas no número de explantes que, apesar de permanecerem vivos, não apresentaram

morfogênese, e no número de explantes que apresentaram contaminação bacteriana (Tabela 1).

Os acessos SP70-1143 e SP71-1405, ambos oriundos do Estado de São Paulo, não apresentaram respostas significativamente diferentes, com 83% dos meristemas apresentando desenvolvimento *in vitro*, caracterizado pelo aumento de tamanho e mudança de formato (Figura 1 A). O potencial organogênico aparentemente superior dos acessos SP foi desfavorecido pelos mais altos índices de contaminação bacteriana, 67% na média.

Os meristemas de RB787750 apresentaram os menores índices de oxidação, porém, a maior mortalidade aos 21 dias de cultivo. O acesso NA56-59 apresentou potencial morfogênico significativamente menor em relação aos demais, apesar de não apresentar o maior índice de oxidação, e não ter havido morte ou contaminação dos explantes. As diferenças entre genótipos foram coerentes com suas diferentes origens, confirmando que a resposta morfogênica de cana-de-açúcar é dependente do genótipo (GANDONOU et al., 2005).

Tabela 1 – Respostas dos meristemas de quatro acessos de cana-de-açúcar após 21 dias *in vitro*. A análise de variância foi feita sobre os valores numéricos e as médias estão expressas em porcentagem.

Acesso	Organogênese			Oxidação	Contaminação	
	Vivos		Mortos		Bacteriana*	Fúngica
	Desenvolvidos	Parados*				
SP70-1143	75	8 b	17	67	75 a	8
SP71-1406	92	0 b	8	58	58 ab	0
RB787750	58	17 b	25	33	25 bc	8
NA56-79	43	57 a	0	43	0 c	0
Média Geral	70	19	14	51	44	5
Pr>F	0,060	0,020	0,530	0,474	0,010	0,646
Transf.	x+10	x+2	x+1	x+4	x+10	Asen(x+5)
CV%	16	24	15	9	12	28

* Médias seguidas de letras distintas, diferem pelo teste de Duncan em nível de 5% de probabilidade de erro.

Apesar de 70% dos meristemas estarem vivos, e com aumento de tamanho, aos 21 dias *in vitro*, a maioria foi descartada devido à proliferação bacteriana. Passada a fase inicial de regeneração a partir do meristema, mais lenta (Figura 1 B), ocorreu a formação de parte aérea com folhas bem diferenciadas (Figura 1 C), e perfilhos foram emitidos continuamente, viabilizando altas taxas de multiplicação (Figuras 1 D e E). A formação de perfilhos em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) foi morfológicamente similar à observada em MP II (LEE et al., 2007).

Independentemente do meio de multiplicação, ocorreu enraizamento após 4 a 5 subcultivos, na ausência de fitorreguladores (Figura 1 F).

A proliferação de microorganismos de origem endógena ao explante é rara no cultivo de meristemas

da maioria das espécies vegetais, pois o meristema é um conjunto de células de formação recente, ainda não vinculado ao sistema vascular (TORRES et al., 1999). Entretanto, no teste preliminar, 100% dos meristemas de 2 a 3 mm foram perdidos por contaminação. No cultivo dos acessos NA56-59, SP70-1143, SP71-1405 e RB787780, uma vez que houve tratamento sanitário mais intenso durante a brotação, a proliferação de microorganismos endógenos foi reduzida para 44% dos meristemas. Apesar disso, essa proporção ainda é muito elevada e bem diferente do registrado em outras espécies, indicando uma adaptação dos microorganismos endógenos na colonização dos tecidos da cana-de-açúcar, inclusive do meristema, registrada para outras variedades de diferentes ambientes (LEE, 1987; HUREK et al., 2002 ;

DONATO et al., 2005; MARTINS et al., 2008).

Mais da metade dos meristemas dos quatro acessos apresentou oxidação fenólica nos primeiros 20 dias *in vitro*, confirmando o registrado para outros genótipos (LORENZO et al., 2001), o que não foi impedimento para a regeneração de plantas.

A grande proporção de meristemas que são perdidos por oxidação e contaminação pode ser

compensada pela alta resposta organogênica de cada explante que permanece viável, o qual pode dar origem a milhares de vitroplantas. Porém, a formação de uma grande população de plantas a partir de um único meristema pode gerar problemas sérios no caso excepcional de uma ou todas as células desse tecido conter ocasionais mutações, variações somaclonais ou epigenéticas (TORRES et al., 1999).

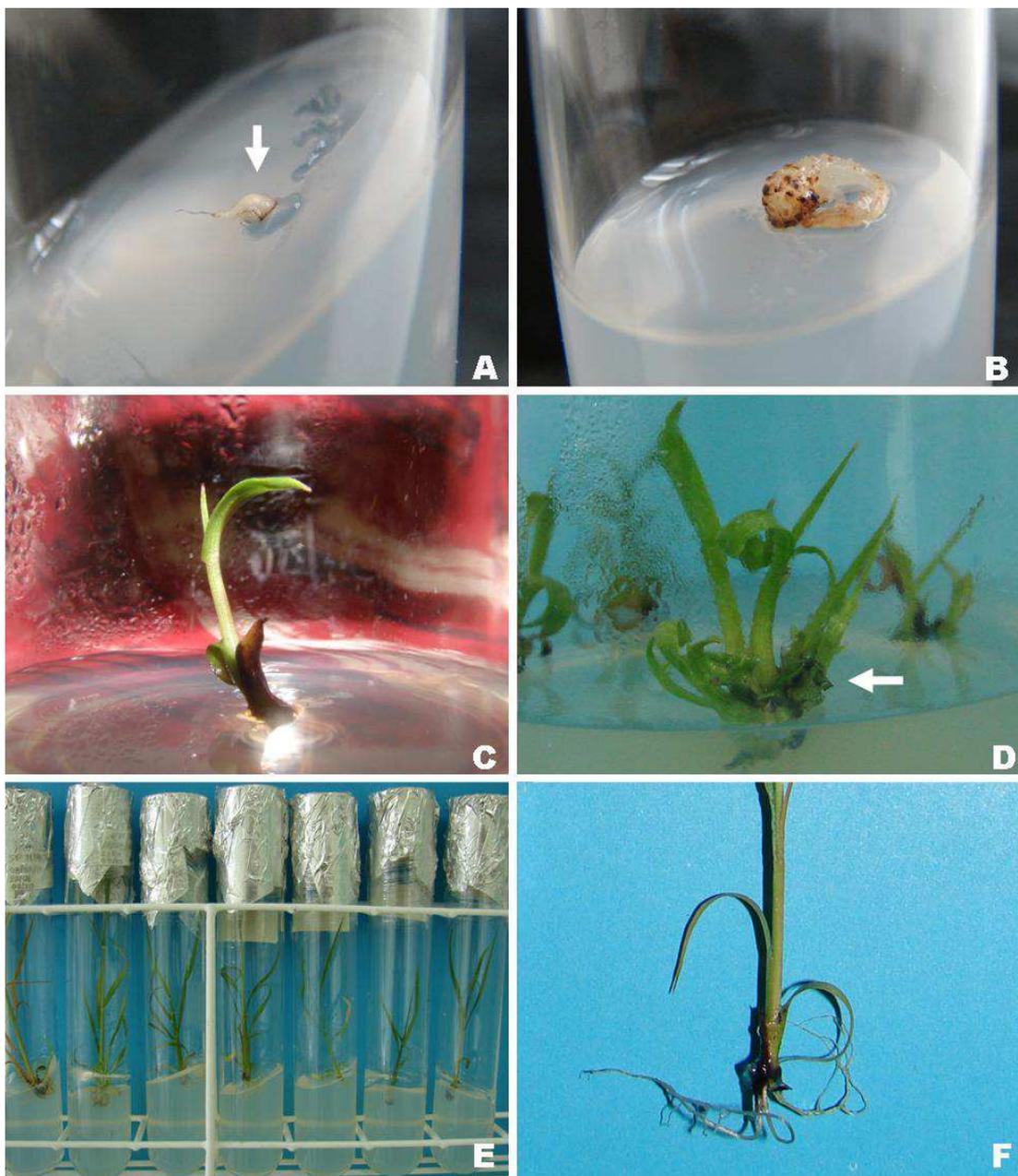


Figura 1 – Micropropagação dos acessos de cana-de-açúcar NA56-79, SP71-1406, RB787750 e SP70-1143, os quais que estão sendo avaliados comparativamente em rede pela FEPAGRO. A) Aumento do tamanho do meristema em meio de indução. B) Organogênese em meristema ainda sem presença de clorofila. Parte do explante apresenta oxidação fenólica. C) Parte aérea com folhas diferenciadas. D) Perfilhamento *in vitro*. E) Multiplicação em meio sem fitorreguladores. F) Raízes emitidas simultaneamente ao perfilhamento após 60 dias de cultivo em meio de multiplicação sem fitorreguladores.

A contaminação bacteriana não esteve presente no material de NA56-59, obtido do Norte da Argentina, diferentemente dos demais acessos, que são brasileiros. É possível que o acúmulo de bactérias endógenas dependa da abundância e da variabilidade desses organismos nos ambientes e em que o material foi cultivado ao longo dos inúmeros ciclos de produção.

Além disso, a avaliação visual excluiu microorganismos que não encontram condições para proliferação no ambiente de cultivo de plantas, tal como inúmeros patógenos (LEIFERT et al., 1994), e não permite identificar organismos endofíticos que têm alguma interação favorável ao metabolismo da cultura (HUREK et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2002).

Por outro lado, foi possível observar que a contaminação fúngica não teve origem endógena e deveu-se à manipulação do material.

As elevadas perdas por contaminação indicaram que toletes de plantas do campo não podem ser usados diretamente para a geração de meristemas em estufa. A geração de matrizes fornecedoras de toletes limpos em condições sanitárias ideais será indispensável para a otimização do protocolo para os acessos disponíveis no Estado.

De acordo com as observações ao longo do trabalho, indica-se uma sequência de procedimentos para a geração de matrizes dos acessos de cana-de-açúcar em cultivo no Rio Grande do Sul, para viabilizar a micropropagação e a limpeza clonal.

1) Coleta de colmos a campo, de plantas vigorosas, sem sinais visíveis da presença de pragas e patógenos, com desempenho produtivo similar e compatível com o observado na variedade.

2) Fricção vigorosa dos colmos com esponja e detergente líquido sob água corrente, para remoção de poeira e fumagina.

3) Individualização dos toletes com emprego de uma serra desinfestada por imersão em etanol 70% por 10 minutos. A serra deve ser desinfestada para cada colmo.

4) Imersão seqüencial dos toletes individualizados em: etanol 70% por 1 min; NaOCl 1% por 40 min; e água destilada estéril a 52°C por 30 minutos para combate às bactérias causadoras das listas cloróticas (CENTEC, 2004).

5) Plantio dos toletes em vasos contendo volume de substrato estéril maior ou igual a 30 litros, dois ou três toletes por vaso, com posterior desbaste das brotações menos desenvolvidas. O substrato pode ser esterilizado por autoclavagem, mesmo que haja perda de propriedades químicas ou físicas, para não ser fator de reinfestação das matrizes.

6) Cultivo do material em ambiente protegido, sob alta luminosidade e temperaturas amenas, sem acesso de vetores de doenças, preferentemente em casa de vegetação com tela anti-afídeo.

7) Aplicação periódica de triadimenol (concentrado emulsionável) ou triadimefom (pó molhável) para combate ao carvão, concomitante ao

crescimento das matrizes (ANDREI, 2005).

8) Rega e aplicação de soluções nutritivas com água potável que não tenha contato com solo ou outras plantas.

9) Indexagem das plantas para as principais viroses registradas na região, a partir do terceiro mês de brotação. Colmos das plantas livres de vírus podem ser empregados como fonte de explantes, inclusive as rebrotas posteriores, desde que o material seja mantido sob cultivo protegido, sem o contato com outros organismos.

Passados cinco a seis meses, os colmos serão cortados e submetidos aos procedimentos de lavagem, fracionamento, desinfestação, instalação em substrato estéril e transferência para estufa visando à indução à brotação, tal como descrito no item Material e Métodos desse trabalho. Desse modo, ainda que exista oferta de entrega de mudas aclimatizadas em 8 a 9 meses por empresas de propagação privadas, a limpeza clonal dos acessos disponíveis pela pesquisa pública do Estado do Rio Grande do Sul requer, no mínimo, cinco meses a mais para a geração de matrizes.

Os resultados desse trabalho subsidiarão iniciativas para o progresso tecnológico da cultura da cana-de-açúcar no Estado do Rio Grande do Sul, pela garantia da sanidade e da origem genética do material propagativo.

Entretanto, uma vez que a demanda por variedades de alto desempenho produtivo tem aumentado no Estado do Rio Grande do Sul, também é necessário que a pesquisa pública tome medidas preventivas para garantia dos direitos dos obtentores de novos genótipos. Empresas privadas de propagação propõem a possibilidade de o produtor selecionar plantas mais produtivas no seu canavial, para micropropagação em massa, originando seleções sobre as quais o produtor teria exclusividade. Tal oferta possibilita a apropriação indevida de variedades já existentes, registradas e até protegidas por seu(s) obtentor(es), uma vez que o fenótipo varia com o ambiente. Nesse caso, paralelamente ao avanço das técnicas de clonagem, a adaptação de técnicas de identificação molecular dos genótipos será necessária para garantir o direito do(s) obtentor(es) sobre o material genético. Tal garantia incentivará iniciativas para o melhoramento genético dessa cultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREI, E. **Compêndio de Defensivos Agrícolas**. São Paulo: Organização Andrei Editora, 2005. 1142p.
CENTEC - INSTITUTO CENTRO DE ENSINO TECNOLÓGICO. **Produtor de Cana-de-Açúcar**. Fortaleza: Ministério da Ciência e Tecnologia, 2004. 64 p. (Caderno tecnológico, 1).

DONATO, V.M.T.S.; ANDRADE, A.G.; TAKAKI, G.M.C.; MARIANO, R.L.M.; MACIEL, G.A. Plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* com antibióticos.

Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v.29, n.1, p.134-141, 2005.

GANDONOU, C.; ERRABII, T.; ABRINI, J.; IDAOMAR, M.; CHIBI, F.; SKALI-SENHAJI, N. Effect of genotype on callus induction and plant regeneration from leaf explants of sugarcane (*Saccharum* sp.). **African Journal of Biotechnology**, Grahamstown, v.4, n.11, p.1250-1255, 2005.

GOMES, J.F.; KICHEL, A.N. **Avaliação de dez cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) na região do vale do Rio Pardo (RS)**. Pelotas: EMBRAPA-CPACT, 1996, 16p. (Boletim de Pesquisa, 1).

HUREK, T.; HADLEY, L.L.; REINHOLD-HUREK, B.; PICHE, Y. *Azoarcus* grass endophytes contribute to fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.15, n.3, p.233-242, 2002.

KAIZU, Y.; OKAMOTO, T.; IMOU, K. Shape recognition and growth measurement of micropropagated sugarcane. **Agricultural Engineering International E-Journal**, Manuscript IT 02003, v.IV, 2002.

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

LEE, T.S.G.; BRESSAN, E.A.; SILVA, A.D.C.; LEE, L.L. Implantação de biofábrica de cana-de-açúcar: riscos e sucessos. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.16 (suplemento digital), 2007.

LEIFERT, C.; MORRIS, C.E.; WAITES, W.M. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field-grown plants: reasons for contamination problems *in vitro*. **Critical Reviews in Plant Science**, Philadelphia, v.13, n.2, p.139-183, 1994.

LORENZO, J.C.; BLANCO, M.D.L.A.; PELÁEZ, O.; GONZÁLEZ, A.; CID, M.; IGLESIAS, A.; GONZÁLEZ, B.; ESCALONA, M.; ESPINOSA, P.; BORROTO, C. Sugarcane micropropagation and phenolic excretion. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.65, p.1-8, 2001.

MALUF, J.R.T.; WESTPHALEN, S.L.; MATZENAUER, R.; MALUF, D.E. **Zoneamento Agroclimático Atualizado para a Cultura da Cana-de-Açúcar no Estado do Rio Grande do Sul, Visando à Produção de Açúcar e Álcool**. Porto Alegre: FEPAGRO, 2008. 80 p. (Boletim técnico, 18).

MARTINS, R.C.R.; BORTOLUCI, J.P.; FLOH, E.I.S.; BARBOSA, H.R. Associações *in vitro* entre bactérias endofíticas diazotróficas e calos de cana-de-açúcar. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE ECOFISIOLOGIA, MATURAÇÃO E MATURADORES EM CANA-DE-AÇÚCAR, I., 2008, Botucatu, **Anais...**, Botucatu: UNESP, v.1, p. 69-75.

MURASHIGE, T.; SKOOG F.A. (1962) Revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.

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

SCHUCH, H. **Subcomissão de Cana-de-Açúcar, Álcool e Etanol**. Porto Alegre: Assembléia Legislativa do Rio Grande do Sul, 2007 (Relatório Digital)

SILVA, S.D.dosA.e; UENO, B.; DAROS, E.; ZAMBON, J.L.C.; BESPALHOK FILHO, J.C.; OLIVEIRA, R.A.; CASAGRANDE JR, J.G. Ensaio de variedades de cana-de-açúcar, Pelotas-RS, safra 2007-2008. In: 2^a REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DE PESQUISA DE AGROENERGIA - RS, 2, 2008, Porto Alegre, **CD-Resumos...**, Pelotas: Embrapa CPACT, 2008. v.2.

TORRES, A.C.; TEIXEIRA, S.L.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds) **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq. 1999. Vol. I. p.133-146.