

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE VARIEDADES SUPERIORES DE CANA-DE-
AÇÚCAR (*Saccharum spp.*)**

**SOMATIC EMBRYOGENESIS IN THE SUPERIOR VARIETY OF SUGARCANE
(*Saccharum spp.*)**

Thays Saynara Alves Menezes¹; Thatiana Carvalho Santos²; Maria de Fátima Arrigoni-Blank³; Arie F. Blank⁴

¹Universidade Federal de Sergipe – UFS – São Cristóvão/SE – Brasil
thayssaynara@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Sergipe – UFS – São Cristóvão/SE – Brasil
thati.carvalho@gmail.com

³Universidade Federal de Sergipe – UFS – São Cristóvão/SE – Brasil
arrigoni@ufs.br

⁴Universidade Federal de Sergipe – UFS – São Cristóvão/SE – Brasil
afblank@ufs.br

Resumo

*A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é uma planta da família Poaceae, cultivada em países das regiões tropical e subtropical. Seu cultivo in vitro já foi descrito para diversos clones através da cultura de calos, meristemas e embriões somáticos. O delineamento foi o inteiramente casualizado com cinco repetições e quatro frascos por repetição com quatro explantes cada frasco. Nos ensaios de indução e multiplicação de calos testou-se concentrações de 2,4-D que variaram entre zero e 6,0 mg.L⁻¹. No ensaio de regeneração de brotações os tratamentos constaram de um controle e combinações de 0,1 a 0,4 mg.L⁻¹ de cinetina e 0,2 a 0,8 mg.L⁻¹ de BAP. Para o enraizamento testou-se MS e MS/2. Na aclimatização testou-se substratos contendo pó de coco e/ou vermiculita suplementado com calcário, fertilizante NPK (3-12-6) e sais do meio MS. Para a indução e a multiplicação dos calos recomenda-se a utilização de 6 mg.L⁻¹ de 2,4-D, para a regeneração das brotações 0,2 mg.L⁻¹ de cinetina e 0,4 mg.L⁻¹ de BAP (9,5 brotações/calor), e para o enraizamento o uso de MS/2. A aclimatização pode ser realizada com pó de coco e vermiculita (2:1 v/v) + 1 g.L⁻¹ de calcário + 12 g.L⁻¹ de NPK (3-12-6).*

Palavras-chave: Calos embriogênicos, reguladores de crescimento, aclimatização

Abstract

*The sugarcane (*Saccharum spp.*) is a plant from the Poaceae family which is cultivated in countries in the tropical and subtropical regions. Its in vitro culture has already been described for several clones through the culture of callus, meristems and somatic embryos. The assay was installed in a totally randomized design with five replications and four flasks per replication with four explants*

each flask. At the induction and multiplication of the calli assays we tested concentrations of 2,4-D which oscillated between zero and $6,0 \text{ mg.L}^{-1}$. Although in the regeneration of shoots the treatments proved a control and combinations of $0,1$ to $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ of kinetin and $0,2$ to $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ of BAP. For rooting we tested MS and MS/2. For the acclimatization we tested substrates containing coconut coir and/or vermiculite compound, limestone, fertilizer NPK (3-12-6) and salts from the MS medium. For the callus induction and multiplication we recommend the use of 6 mg.L^{-1} of 2,4-D, for the regeneration of shoots $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ of kinetin, and $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ of BAP (9,5 shoots/callus) and the rooting process in MS/2. The acclimatization can be done with coconut powder and vermiculite (2:1 v/v) + 1 g.L^{-1} of limestone + 12 g.L^{-1} of NPK (3-12-6).

Key words: Embryogenesis callus, Growth controllers, acclimatization

1. Introdução

A cana-de-açúcar (*Saccharum* ssp.) é uma planta da família Poaceae, perene, bastante cultivada em países das regiões tropical e subtropical. É amplamente cultivada em escala mundial devido a sua importância econômica (PICELLI, 2010). Além de servir como matéria prima para a produção de açúcar e álcool, pode-se utilizar a cana na produção de aguardente, rapadura, melado, papel e ainda na alimentação animal (HEERDT, 2008).

Dentre as práticas da cultura de tecidos utilizadas na produção de mudas em massa, destaca-se a embriogênese somática, que é o processo pelo qual células ou tecidos somáticos se desenvolvem até a formação completa de uma planta através de uma série de estágios característicos do desenvolvimento de embriões zigóticos (BARROS, 1999). Esta ainda pode ocorrer de forma direta ou indireta, ou seja, passando pela fase de calo.

A micropropagação massiva é atualmente usada para a multiplicação de novas variedades em muitos países produtores de cana-de-açúcar. A partir do lançamento de novas variedades, a disponibilização em larga escala do material melhorado é uma etapa crucial para a implantação de cultivos com os genótipos elite (LIMA, 2010).

Uma vez produzidas as mudas *in vitro*, deve-se fazer a aclimatização das plantas. Esse processo é a última etapa do protocolo de micropropagação sendo uma fase crítica, visto que, as plantas precisam suportar a transição da condição *in vitro* para a *ex vitro*, ou seja, alterar seu metabolismo da condição heterotrófica para condição autotrófica.

O objetivo foi obter um protocolo de regeneração de plantas de cana-de-açúcar via embriogênese somática mediante a utilização de material vegetal.

2. Revisão de literatura

A cana-de-açúcar é uma planta da família Poaceae, pertencente ao gênero *Saccharum* com pelo menos seis espécies do gênero, sendo a cana-de-açúcar cultivada um híbrido multiespecífico, recebendo a designação *Saccharum* spp. As espécies de cana-de-açúcar são provenientes do Sudeste Asiático. O principal uso está na utilização como matéria-prima para a fabricação do açúcar e álcool (etanol) (SILVA et al., 2010), sendo também utilizada na produção de papel, melaço, rapadura, aguardente dentre outros.

A propagação *in vitro*, também denominada de micropropagação devido ao tamanho dos propágulos utilizados, é a técnica de maior aplicabilidade da cultura de tecidos e aquela de maior impacto, uma vez que proporciona obtenção de um grande número de plantas com elevado nível qualitativo. Algumas vantagens são obtidas na produção de mudas micropropagadas tais como a seleção de características de interesse, a utilização de pequenos espaços para a produção das mudas, a obtenção de plantas livres de patógenos, dentre outros (SANTOS, 2011).

A adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura tem função de suprir as deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras da planta matriz (SCHMILDT et al., 2007).

Dentre os caminhos para obtenção de plantas *in vitro* via tecido vegetal encontra-se a embriogênese somática. Esta apresenta algumas vantagens quando comparada a outros sistemas *in vitro*, tais como: a sua alta taxa de multiplicação, a possibilidade de criopreservação de calos embriogênicos, o potencial para culturas em suspensão líquida e o uso de biorreatores e tecnologias de sementes sintéticas e somáticas (KARAMI, 2008).

Embriogênese somática desempenha um papel importante na propagação clonal. Quando integrado com programas de melhoramento genético convencional e molecular, a embriogênese somática fornece uma ferramenta valiosa para aumentar o ritmo de melhoramento genético de espécies de culturas comerciais (FIGUEROA, 2006).

3. Materiais e métodos

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos e Melhoramento Vegetal do Departamento de Engenharia Agrônômica (DEA) da Universidade Federal de Sergipe (UFS). A aclimatização das mudas micropropagadas foi realizada em estufa agrícola, localizada no mesmo departamento, em tela sombrite de 50% sob irrigação e nebulização intermitentes.

O meio de cultura utilizado foi o meio básico MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose e 7 g.L⁻¹ de ágar, adicionando-se as concentrações de reguladores adequadas para cada experimento como será descrito a seguir. Em todos os casos o pH do meio foi

ajustado para $5,8 \pm 0,1$ e submetido a autoclavagem por 15 minutos a uma temperatura de $121 \pm 1^\circ\text{C}$ e pressão de 1,05 atm.

Os ensaios de indução de calos foram feitos em placas de petri de 10 cm de diâmetro e 2 cm de altura, contendo 25 mL de meio, vedadas com filme PVC e mantidas no escuro em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, quando que o ensaio de indução de brotações foi executado em frascos de 250 mL contendo 25 mL de meio e mantido na mesma temperatura em fotoperíodo de 12 horas de luz e intensidade luminosa de $60 \mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cada parcela representada por quatro placas ou frascos com quatro explantes em cada.

Na indução de calos embriogênicos com 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D) foi utilizado MS + 100 mg.L^{-1} de PVP. Os tratamentos foram 0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 mg.L^{-1} de 2,4-D. Os explantes foram dispostos aleatoriamente em contato com o meio de cultura. Após inoculação as placas de Petri foram mantidas no escuro e após 30 dias avaliou-se a porcentagem de indução de calos embriogênicos, tamanho dos calos de acordo com a seguinte escala de notas: P= 0,1-1,0; M= 1,1-2,0; G= 2,1-3,0, textura e coloração.

A multiplicação dos calos embriogênicos o meio de cultura MS foi suplementado com 500 mg.L^{-1} de caseína hidrolizada e 100 mg.L^{-1} de PVP. Os tratamentos foram: 0,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 mg.L^{-1} de 2,4-D. No final de 30 dias os calos embriogênicos foram avaliados conforme o experimento anterior.

Para a indução de brotações a partir dos calos embriogênicos o meio de cultura MS foi suplementado com 500 mg.L^{-1} de caseína hidrolizada e 100 mg.L^{-1} de PVP. Os tratamentos foram: MS; 0,1 mg.L^{-1} de cinetina + 0,2 mg.L^{-1} de BAP; 0,2 mg.L^{-1} de cinetina + 0,4 mg.L^{-1} de BAP; 0,3 mg.L^{-1} de cinetina + 0,6 mg.L^{-1} de BAP; 0,4 mg.L^{-1} de cinetina + 0,8 mg.L^{-1} de BAP.

Os tratamentos foram inoculados com os calos cultivados no melhor tratamento de indução, estes foram subdivididos em frações de 3 mm e incubados no escuro por 15 dias. Após este período, os calos foram transferidos para a luz e no final dos 30 dias, foi avaliada a porcentagem de calos com brotações e o número de brotações por calo.

No alongamento e enraizamento as brotações foram individualizadas e em seguida repicadas em frascos contendo os meios de cultura MS e MS/2 acrescido de 100 mg.L^{-1} de PVP. Após 30 dias, as brotações alongadas tiveram a área foliar reduzida e foram repicadas para o mesmo meio de cultura anterior e incubadas por mais 30 dias sob condição de luz. No final deste período, foi avaliada a porcentagem de brotações enraizadas.

Para aclimatização das mudas micropropagadas aos 30 dias as plantas foram retiradas dos frascos, procedendo-se a lavagem em água corrente para eliminação do meio de cultura aderida às

raízes e transferida para bandejas de poliestireno expandido com 72 alvéolos, contendo os diferentes tratamentos.

Os substratos foram S1: PCB - Pó de coco + 1 g.L⁻¹ de calcário + 12 g.L⁻¹ de Biosafra[®] (3-12-6); S2: PCBV - Pó de coco + vermiculita (1:1 v/v) + 1 g.L⁻¹ de calcário + 12 g.L⁻¹ de Biosafra[®] (3-12-6); S3: PCBV - Pó de coco + vermiculita (2:1 v/v) + 1 g.L⁻¹ de calcário + 12 g.L⁻¹ de Biosafra[®] (3-12-6); S4: VMS - Vermiculita + sais do MS, sendo 15 mL da mistura de sais por planta; S5: VB - Vermiculita + 12 g.L⁻¹ de Biosafra[®] (3-12-6) e S6: PCMS - Pó de coco + 1 g.L⁻¹ de calcário + sais do MS com quatro repetições. Cada unidade experimental será constituída por cinco mudas. Para os tratamentos que se utilizou sais MS foi acrescido num volume de 15 mL por tubete semanalmente

Aos 30 dias foi avaliada a porcentagem de sobrevivência (%), altura de planta (cm) comprimento de raiz (cm), comprimento (cm) e número de brotos, número de folhas e massa (mg) fresca e seca de parte aérea e de raiz.. Para a obtenção de massa seca o material foi mantido em estufa de secagem com circulação de ar a temperatura de 40°C por 3 dias.

Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e, quando significativos, comparados por regressão polinomial e teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4. Resultados e discussão

Na indução de calos embriogênicos com 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D) na ausência de regulador de crescimento não houve formação de calos, enquanto que com a utilização de 2,4-D (1,0-6,0 mg.L⁻¹) a formação de calos foi de 100%. Resultados semelhantes foram obtidos por Lima (2010) com a utilização de explantes de folha das variedades RB739735 e RB72454, nos quais originaram calos (70 e 100%), quando cultivados em meio MS suplementado com 3,0 mg.L⁻¹ 2,4-D.

Com relação aos tamanhos dos calos, foram observadas diferenças significativas para as diferentes concentrações de 2,4-D utilizadas. O resultado foi representado por uma equação linear positiva, isto é, com o aumento das concentrações do regulador, aumentou-se também os valores para a média de tamanho, sendo a concentração de 6 mg.L⁻¹ a que proporcionou os maiores calos (2,99), ou seja, do tipo G (grande) (Figura 1). De acordo com Silva (2010) o 2,4-D tem se mostrado o mais eficiente para a indução de calos e formação de embriões somáticos em cultura de células e tecidos de gramíneas, incluindo a cana-de-açúcar.

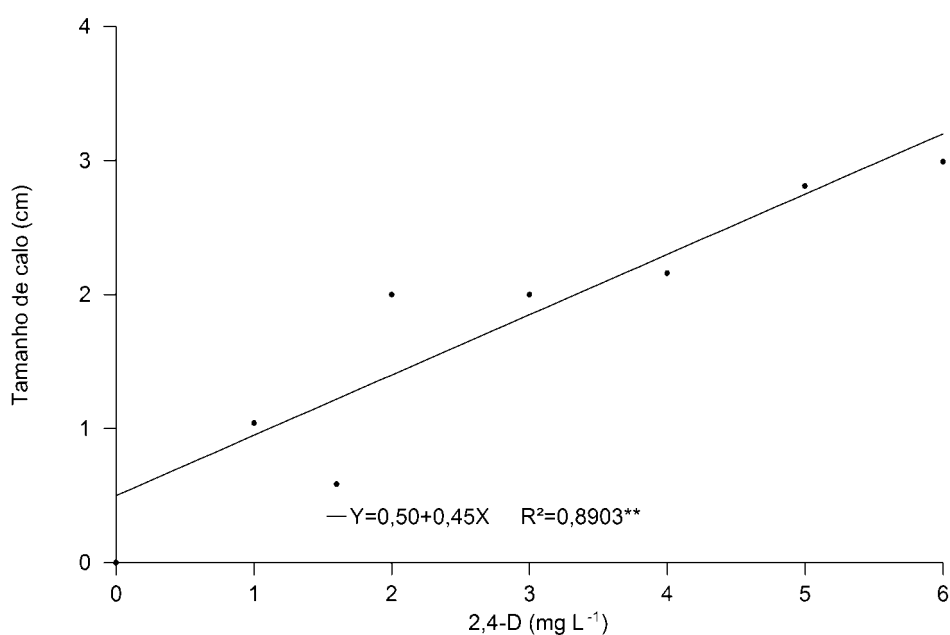


FIGURA 1. Indução de calos (cm) de cana de açúcar (*Saccharum* spp.) cultivar RB 931003 em função das diferentes concentrações 2,4 D. São Cristóvão, UFS, 2011.

Com relação à textura e coloração, os calos formados apresentaram-se friáveis e amarelos. Para Heerdt (2008) utilizando 2,4-D em seus experimentos, observou calos amarelos compactos, amarelos friáveis e brancos friáveis. Enquanto que, Silva (2009), os calos apresentaram-se com coloração bege, marrom-claro ou marrom-escuro e, quanto à textura, eram friáveis ou mucilaginosos utilizando-se 0, 2, 4 e 8 mg.L⁻¹ de 2,4-D.

Na fase de multiplicação, o tratamento sem regulador de crescimento proporcionou a morte dos calos em sua totalidade. Houve diferenças significativas entre as concentrações de 2,4-D para o tamanho dos calos nessa fase, os valores encontrados foram representados por uma equação linear sendo a concentração de 6 mg.L⁻¹ a que proporcionou calos grandes (3,0 cm) (Figura 2).

Com relação à textura verificou-se que os calos tinham um aspecto gelatinoso e compacto e a coloração notou-se alguns calos esbranquiçados e amarelos. Heerdt (2008) também observou calos com aspectos gelatinosos em diferentes estádios de desenvolvimento e, os calos cultivados em meio de cultura com 6 mg.L⁻¹ de 2,4-D mostraram coloração opaco-amarelada nos seus diferentes estágios de desenvolvimento.

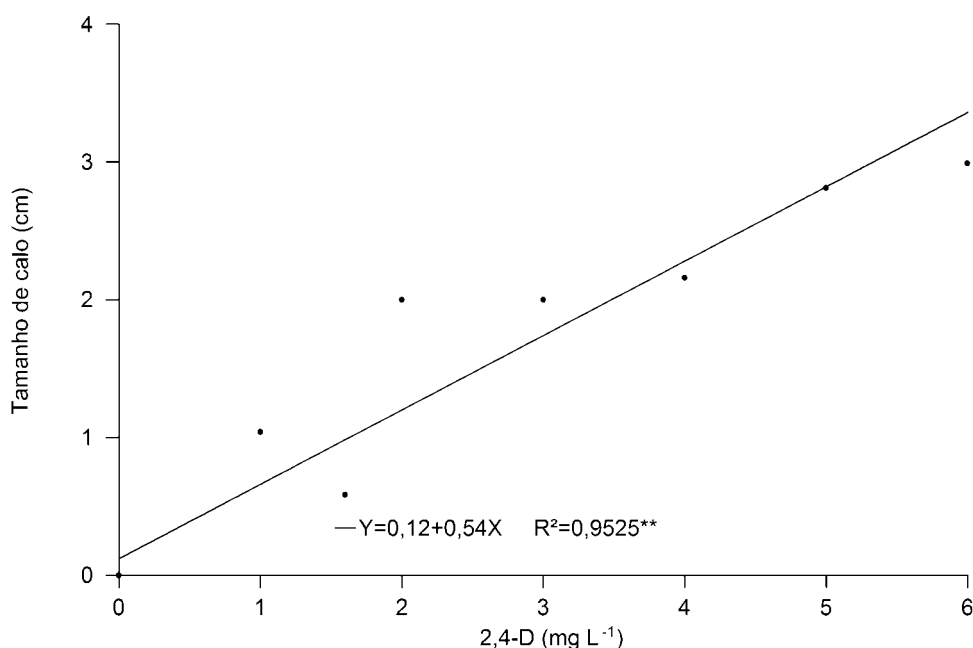


FIGURA 2. Multiplicação de Calos (cm) de cana de açúcar (*Saccharum* spp.) cultivar RB 931003 em função das diferentes concentrações 2,4 D. São Cristóvão, UFS, 2011.

Para a variável porcentagem de indução de brotações em calos de cana, o tratamento sem regulador de crescimento apresentou valor nulo. Todos os outros não diferiram estatisticamente entre si, mostrando assim a necessidade da adição de citocininas ao meio de cultura para induzir regenerações de embriões em cana de açúcar na variedade RB 931003, as taxas ficaram entre 76,25 e 81,25 % (Tabela 1).

A melhor resposta alcançada por Behera e Sahoo (2009) para a indução de brotações foi utilizando 2,0 mg.L⁻¹ BAP e 0,5 mg.L⁻¹ ANA. Em contrapartida, Guedes (2008), mostrou que o efeito da concentração de BAP sobre a porcentagem de embriões que possuíam um único broto dependeu do clone avaliado, mas a regeneração aumentou de 60% para 73% na presença de 1,0 mg.L⁻¹ de BAP.

TABELA 1. Porcentagem de calos com brotações (%) e número de brotações/calos em cana de açúcar (*Saccharum* spp.) cultivar RB 931003 em função das diferentes concentrações de Cinetina e BAP. São Cristóvão, UFS, 2011.

Cinetina:BAP (mg.L ⁻¹)	Calos com brotações (%)	Números de brotações/ Calos
0,0 : 0,0	0,0 b	0,0 d
0,1 : 0,2	81,2 a	6,3 b
0,2 : 0,4	78,7 a	9,5 a
0,3 : 0,6	80,0 a	4,8 bc
0,4 : 0,8	76,2 a	3,7 c
CV (%)	28,00	8,89

*Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Com relação aos números de brotações por calos, as diferentes concentrações de reguladores de crescimento apresentaram diferenças significativas entre si. Os melhores resultados foram representados por $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cinetina e $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, com 9,5 brotações/calos (Tabela 1). Resultado diferente foi apresentado por Singh (2003) que concluiu que o meio MS acrescido com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cinetina ou $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cinetina proporcionaram melhores brotações.

Com relação ao alongamento e enraizamento as brotações cultivadas *in vitro* não apresentaram diferenças entre os tratamentos, sendo ambos eficientes para alongar e enraizar as plantas de cana variedade RB 931003. A produção das raízes é facilmente conseguida em algumas espécies, reduzindo o nível de citocininas ou em meio MS, com ou sem a adição extra de auxinas (SANTOS, 2011). Resultado diferente foi apresentado por Singh (2003) com boas taxas de enraizamento em cana-de-açúcar, acrescentando 5 mg.L^{-1} de ANA e 70 g.L^{-1} de sacarose aos sais do meio MS. Em abacaxizeiro as brotações foram induzidas em meio MS básico sem adição de fitorreguladores (MACÊDO et al., 2003).

Na aclimatização de plantas micropropagadas da “RB93100” de cana-de-açúcar, os diferentes substratos utilizados proporcionaram 100% de sobrevivência das plantas. Para as variáveis altura de planta, comprimento de raiz, número de brotos e folhas e massa seca de parte aérea e de raiz, os substratos VB, VMS, PCBV (1:1) e PCBV (2:1) não apresentaram diferenças significativas entre si, sendo estes substratos os que proporcionaram os maiores valores (Tabela 2).

TABELA 2. Altura de planta (cm), comprimento de raiz (cm) número de brotos e folhas e massa seca (mg) de parte aérea e raiz de cana de açúcar (*Saccharum* spp.) cultivar RB 931003 em função de diferentes misturas de substrato. São Cristóvão, UFS, 2011.

Substratos	Altura de planta (cm)	Comprimento de raiz (cm)	Nº de brotos	Nº de folhas	MSPA (mg)	MSR (mg)
VB	35,38 a	13,82 a	2,90 a	3,36 a	10,70 a	6,78 a
VMS	31,51 ab	12,16 ab	2,40 ab	3,26 a	9,57 ab	6,44 ab
PCBV (1:1)	27,85 ab	10,87 abc	2,35 ab	3,21 a	8,86 abc	6,27 ab
PCBV (2:1)	25,87 ab	9,00 abc	2,25 ab	3,01 ab	7,50 abc	4,80 ab
PCMS	23,55 bc	8,54 dc	2,10 ab	2,97 ab	6,94 cd	4,39 ab
PCB	16,98 c	6,70 d	1,70 b	2,51 b	6,00 d	4,05 b
CV (%)	14,62	13,23	15,52	10,10	13,26	20,04

*Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ** VB - Vermiculita + 12 g.L^{-1} de Biosafra® (3-12-6); VMS - Vermiculita + sais do MS; PCBV - Pó de coco + vermiculita (1:1 v/v) + 1 g.L^{-1} de calcário + 12 g.L^{-1} de Biosafra® (3-12-6); PCBV - Pó de coco + vermiculita (2:1 v/v) + 1 g.L^{-1} de calcário + 12 g.L^{-1} de Biosafra® (3-12-6); PCMS - Pó de coco + 1 g.L^{-1} de calcário + sais do MS e PCB - Pó de coco + 1 g.L^{-1} de calcário + 12 g.L^{-1} de Biosafra® (3-12-6).

O pó de coco é considerado substrato praticamente inerte, pois não reage com os nutrientes da adubação e possuem longa durabilidade, sem alteração de suas características físicas (SANTOS et al., 2004), sendo portanto recomendável para aclimatização de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar.

Em vetiver (*C. zizanioides*), as taxas de sobrevivência foram superior a 90 % para esses mesmos substratos utilizados nesse experimento, não havendo diferenças entre a utilização deles para as variáveis massa seca de parte aérea e raiz. (SANTOS, 2011).

5. Conclusões

- Para indução e multiplicação de calos de cana de açúcar de RB 931003, recomenda-se a utilização de 6 mg.L⁻¹ de 2,4-D;
- Na regeneração das brotações recomenda-se o uso de 0,2 mg.L⁻¹ cinetina e 0,4 mg.L⁻¹ de BAP;
- Para o enraizamento pode ser utilizado o meio MS/2;
- Para aclimatização de mudas micropropagadas, recomenda-se a utilização da mistura de pó de coco + vermiculita (2:1 v/v) + 1 g.L⁻¹ de calcário + 12 g.L⁻¹ de Biosafra[®] (3-12-6).

6. Referências bibliográficas

BEHERA, K. K.; SAHOO, S. Rapid In vitro Micropropagation of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L. cv-Nayana) Through Callus Culture. **Nature and Science**, v. 7, n. 4, p. 01-10, 2009.

BARROS, L. M. Embriogênese Somática. Pré-requisito para o emprego de algumas técnicas de biotecnologia no melhoramento genético de plantas perenes. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. v. 2, n. 7, p. 36-39, 1999.

FIGUEROA, F. R. Q., HERRERA, R. R., AVALOS, R. M. G., VARGAS, V. M. L., Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, 86:285–301, p.286, 2006.

GUEDES, R. S., Embriogênese somática e regeneração de plantas dendezeiro. 2008. 126f. Dissertação (Mestre em Agronomia) - Programa de Pós-graduação em Agronomia, Rio Branco, 2008.

HEERDT, E. Indução da embriogênese somática em cana-de-açúcar. 2008. 55f. (Dissertação) - Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento. Viçosa, Minas Gerais, 2008.

KARAMI, O., Induction of Embryogenic Callus and Plant Regeneration in Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) **OnLine Journal of Biological Sciences**, 8 (4): 68-72, p.68, 2008.

LIMA, G. V. M., Ação de auxinas e cofatores fenólicos no enraizamento *in vitro* de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). 2010. 96f. (Dissertação) - Programa de Pós-Graduação Botânica, UFRPE, Recife, 2010.

MACÊDO, C. E. C. de; SILVA, M. G. da; NÓBREGA, F. S. da; MARTINS, C. P.; BARROSO, P. A. V.; ALLOUFA, M. A. I. Concentrações de ANA e BAP na micropropagação de abacaxizeiro L. Merrill (*Ananas comosus*) e no cultivo hidropônico das plântulas obtidas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 3, p. 501-504, 2003.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-479, 1962.
- PICELLI, E. C. M., Cultura de tecidos e transformação genética com o gene Ddm1 no estudo do silenciamento de elementos de transposição em cana-de-açúcar. 2010. 141f. (Dissertação) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de plantas. Piracicaba, São Paulo. 2010.
- SANTOS, M. R. A. dos; TIMBÓ, A. L. de O.; CARVALHO, A. C. P. P. de MORAIS, J. P. S. Avaliação de substratos e adubos orgânicos na aclimatização de plântulas de *Heliconia psittacorum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.10, p. 1049-1051, 2004.
- SANTOS, T. C. Propagação e conservação *in vitro* de vetiver [*chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty]. 2011. 59f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) – Núcleo em Pós-Graduação em Biotecnologia, São Cristóvão, Sergipe. 2011.
- SINGH, R. Tissue Culture Studies of Sugarcane. 2003. 62f. Dissertação (Masters of science in biotechnology) - Thapar Institute of Engineering na Technology Patiala, Índia, 2003.
- SILVA, M. M. A., HERCULANO, L., CAMARA, T. R., Morfogênese *in vitro* de cana-de-açúcar (RB 872552) via embriogênese somática indireta. In: X JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX 2010 – UFRPE, **Anais**, Recife, 18 a 22 de Outubro, 2010.
- SILVA, L. E., SILVA, M. M. A., WILLADINO, L., CAMARA, T. R., Indução de embriogênese somática indireta em cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). In: IX Jornada de ensino, pesquisa e extensão- JEPEX 2009- UFRPE, **Anais**, Recife, 19 a 23 de Outubro, 2009.
- SCHMILDT, O.; SCHMILDT, E. R.; AMARAL, J.A.T.; Cinetina e ANA na multiplicação *in vitro* de mamoeiro ‘tainung’. **Scientia Agrária**, v.8, n.1, p.55-60, 2007.