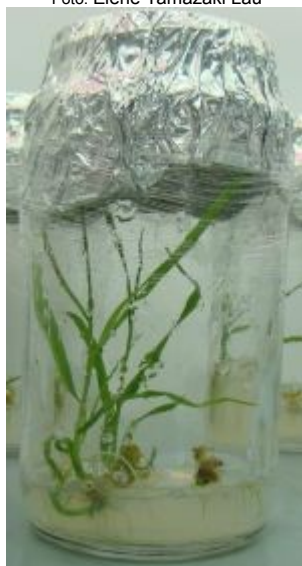


Indução de calos e regeneração *in vitro* de cultivares de trigo a partir de embriões maduros visando a transformação genética

Foto: Elene Yamazaki Lau



Elene Yamazaki Lau¹
Andréa Morás²
Márcio Nicolau³
Sandra Maria Mansur Scagliusi¹
Magali Ferrari Grando⁴
Márcio Só e Silva¹

Introdução

A transgenia é uma das ferramentas biotecnológicas que pode auxiliar os programas de melhoramento de plantas de maneira única. Esta ferramenta permite introduzir genes sem levar fragmentos de DNA próximos a ele no genoma, como ocorre em cruzamentos convencionais. Os genes podem ser provenientes de diferentes espécies, e também aqueles modificados artificialmente não existentes na natureza. Uma das grandes dificuldades para estabelecer a transgenia em trigo foi o caráter recalcitrante à regeneração *in vitro* de plantas por meio da cultura de tecidos (JONES, 2005). A dependência do genótipo e do tipo de explante inicial são alguns dos vários fatores que influenciam a regeneração *in vitro*. No Brasil, embora alguns genótipos de trigo tenham sido avaliados quanto à capacidade de regeneração (MILACH et al., 1991; HANDEL et al., 1995; DORNELLES et al., 1997; VENDRUSCOLO et al., 2008, NEIVERTH et al., 2010), cabe ressaltar que ainda não há dados para a grande maioria dos materiais brasileiros.

¹Pesquisador, Embrapa Trigo, Rodovia BR 285, km 294, Caixa Postal 451, 99001-970, Passo Fundo, RS.

²Assistente, Embrapa Trigo.

³Analista, Embrapa Trigo.

⁴Professora, UPF-FAMV, Rodovia BR 285, km 171, Caixa Postal 611, 99001-970, Passo Fundo, RS.

A transgenia pode ser muito útil em situações de difícil resolução por métodos convencionais de melhoramento. Uma destas características agrônômicas é a tolerância ao déficit hídrico, pois o fenótipo é altamente influenciado pelo ambiente e o mecanismo de ação é extremamente complexo (LEUNG, 2008; WITCOMBE et al., 2008). No caso de trigo, esta é uma das características essenciais para o cultivo no Cerrado. A cultivar modelo para fins de regeneração *in vitro* e transformação genética é a Bobwhite, desenvolvida pelo CIMMYT. No entanto, a mesma não é agronomicamente nem qualitativamente superior. Este fato torna necessária a inclusão destas características após a obtenção das plantas transgênicas, demandando mais tempo para obter uma cultivar comercializável. O uso de material genético para o processo de transformação genética mais adequado ao ambiente de utilização seria mais recomendável, no entanto, é necessário determinar a sua capacidade de regeneração *in vitro* e de transformação.

O tipo de explante mais utilizado para a transformação genética de trigo é o embrião imaturo, mais especificamente o escutelo do embrião imaturo (JONES, 2005). Apesar da boa resposta *in vitro*, é preciso manter plantas doadoras constantemente e, em épocas do ano desfavoráveis ao cultivo, é necessário ter disponibilidade de estrutura para manter as condições ambientais controladas adequadamente. Sementes maduras (ou embriões maduros) tem sido utilizadas como alternativa, pois, uma vez produzidas, podem ser utilizadas em qualquer época do ano (PATNAIK et al., 2006; DING et al., 2009), embora não sejam tão responsivas quanto os embriões imaturos. Outra vantagem é o fácil manuseio, visto que são relativamente maiores do que os embriões imaturos. Os explantes embriões maduros são utilizados conectados (ÖZGEN et al., 1996, 1998; CHEN et al., 2006) ou não ao endosperma (feridos, sectados ou inteiros) (PATNAIK; KHURANA, 2003; ZALE et al., 2004; NASIRCILAR et al., 2006; BI et al., 2007; HAN et al., 2007; YU; WEI, 2008; DING et al., 2009; NEIVERTH et al., 2010).

Um dos desafios para o início de atividades científicas previamente relatadas é a repetibilidade de protocolos já publicados, visto que muitas vezes as condições disponíveis não são exatamente iguais aos da origem do trabalho, além da adequada descrição das etapas na publicação.

Em vista do acima exposto, este trabalho teve por objetivo verificar a resposta de duas cultivares de trigo recomendadas para as condições de sequeiro no cerrado brasileiro e a cultivar controle Bobwhite em dois protocolos de indução e regeneração de embriões somáticos a partir de embriões maduros.

Material e métodos

1. Material vegetal

Os genótipos utilizados foram: Bobwhite SH9826 (controle responsivo à regeneração *in vitro* e transformação genética), BR18-Terena (cultivo de sequeiro, moderadamente tolerante ao déficit hídrico), MGS1-Aliança (cultivo de sequeiro, tolerante ao déficit hídrico).

As sementes foram desinfestadas em etanol 70% (v/v) durante cinco minutos, seguida de imersão em solução de água sanitária comercial 50% (v/v) e Tween 20 a 0,1% (v/v) durante 20 minutos, e cinco enxágues com água estéril. Após o último enxágue, foram mantidas sob agitação de 100 rpm em água estéril durante 2 horas a 33 °C. Em condições assépticas, foram efetuados três ferimentos nas sementes (cortes com lâmina de bisturi) na região do embrião. Os explantes foram preparados desta maneira de acordo com experimento preliminar, onde esta forma de cortes proporcionou maior percentagem de formação de calos. As sementes foram colocadas em placas de petri contendo meio de cultura, com a região dos ferimentos em contato com o meio. Para cada tratamento foram utilizadas seis placas, cada uma contendo 15 explantes (sementes), totalizando 75 explantes, mantidas em salas de cultura a 25±2°C, no escuro ou com intensidade luminosa de 30 µmol.m⁻².s⁻¹ e 16 h de fotoperíodo.

2. Protocolos e meios de cultura

Os protocolos utilizados neste trabalho foram originalmente utilizados para transformar trigo via *Agrobacterium tumefaciens* (DING et al., 2009) ou bombardeamento de partículas (PATNAIK; KHURANA, 2003). Para estes ensaios, foram aplicados somente as etapas de regeneração de plantas e não foram utilizados antibióticos, herbicidas, acetosiringona ou adjuvantes. Os meios de cultura foram separados em dois volumes para a esterilização: 40% contendo o ágar foi autoclavado e 60% contendo os componentes restantes foram filtroesterilizados. Antes de serem misturados e vertidos nos recipientes adequados, a temperatura dos meios de cultura foi ajustada para próximo de 55 °C, sendo suportável ao manuseio.

2.1 – Protocolo D – Ding et al. (2009), com modificações

a) As sementes foram colocadas em **meio de pré-cultivo/indução** (macro e micronutrientes MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), FeNa₂.EDTA MS, vitaminas MS, 100 mg/l de inositol, 500 mg/l de glutamina, 100 mg/l de caseína hidrolisada, 100 mg/l de ácido ascórbico, 1,95 g/l de MES, 40 g/l de maltose, 1 mg/l de picloram, 7 g/l de ágar e pH 5,7) no escuro durante 14 dias, na sala de cultura;

b) em seguida, as sementes foram transferidas para o mesmo meio de cultura e mantidas por três semanas no escuro;

c) após este período, os calos foram separados do tecido original, transferidos para o meio **R_{Dz}** (macro e micronutrientes L7, vitaminas MS, FeNa₂.EDTA MS, 100 mg/l de inositol, 30 g/l de maltose, 5 mg/l de zeatina, 0,1 mg/l de 2.4-D, 7 g/l de ágar e pH 5,7) e mantidos durante mais três semanas na luz;

d) em seguida, as plântulas regeneradas foram transferidas para o meio de **Regeneração** (macro e micronutrientes L7, vitaminas MS, FeNa₂.EDTA MS, 100 mg/l de inositol, 30 g/l de maltose, 7 g/l de ágar e pH 5,7) e mantidas durante três semanas, sendo então efetuada a avaliação.

O gelificante citado no protocolo original é o agargel a 6 g/l, mas foi substituído pelo ágar a 7 g/l, assim como 200 mg/l de inositol foi substituído por 100 mg/l de inositol.

O tempo requerido até o final do protocolo é de 75 dias.

2.2 – Protocolo PK – Patnaik & Khurana (2003), com modificações

a) As sementes foram colocadas em meio **MSE2** (macro e micronutrientes MS, vitaminas MS, FeNa₂.EDTA MS, 100 mg/l de inositol, 200 mg/l de caseína hidrolisada, 2 mg/l de 2,4-D, 30 g/l de sacarose, 7 g/l de ágar e pH 5,8) e mantidas no escuro durante duas semanas, na sala de cultura;

b) os calos do tecido original foram separados do tecido original e transferidos para novo meio **MSE2**, na luz, e mantidos por três semanas;

c) após este período, os calos foram novamente transferidos para **MSE2** e mantidos por mais três semanas;

d) os calos foram transferidos para o meio **MSER** (macro e micronutrientes MS, vitaminas MS, FeNa₂.EDTA MS, 100 mg/l de inositol, 200 mg/l de caseína hidrolisada, 0,5 mg/l de BAP, 0,02 mg/l de NAA, 30 g/l de sacarose, 7 g/l de ágar e pH 5,8) e mantidos por duas semanas;

e) os calos foram transferidos para o meio $\frac{1}{2}$ **MS** (metade da concentração macro e micronutrientes MS, metade da concentração das vitaminas MS, metade da concentração de FeNa₂.EDTA MS, 50 mg/l de inositol, 15 g/l de sacarose, 7 g/l de ágar e pH 5,8), mantidos por três semanas e avaliados.

O tempo requerido até o final do protocolo é de 77 dias.

3. Avaliações

Foram avaliados o percentual da indução de calos considerando o número de explantes com formação de calos em relação ao número de explantes iniciais; o percentual de regeneração de plantas considerando o número de plantas regeneradas em relação ao número de calos formados e a quantidade de brotações por calo, considerando todos os calos formados, com ou sem brotações. Foi avaliada também a eficiência de regeneração, representada pela razão entre o número de calos que regeneraram e o número total de explantes iniciais.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado.

As análises estatísticas foram realizadas em três etapas, nas quais procuraram-se avaliar a influência dos efeitos das cultivares e protocolos nas informações/medições obtidas em cada etapa do experimento, na seguinte sequência: (i) modelo logístico para ajuste da probabilidade de se obter calos; (ii) modelo de Poisson para ajuste do número de calos com brotações, na presença de super-dispersão e ponderados pelo número de calos obtidos na etapa (i) e (iii) modelo de Poisson para ajuste do número de brotações por calo, ponderados pelo número de calos com brotação obtidos na etapa (ii). Todas as análises foram realizadas no software estatístico R (THE R PROJECT... 2010) e o nível de significância foi fixado ao nível de 5% de probabilidade.

Resultados

Para fins de implementação de protocolo para transformação genética, é interessante testar previamente o(s) protocolo(s) selecionado(s) assim como os materiais genéticos candidatos a serem transformados e também as possibilidades de uso de diferentes tipos de explantes. É aconselhável correlacionar estas variáveis com a capacidade de regeneração *in vitro* antes de executar de fato a transformação genética, visto que a informação prévia poderá evitar o grande dispêndio de mão-de-obra, tempo e reagentes. Quanto maior a capacidade de regeneração, maiores as chances de obter eventos de transformação com um menor número de explantes iniciais. Após esta etapa, é necessário adaptar o processo de regeneração *in vitro* com o processo de transformação genética. Em vista disso, este estudo baseou-se em protocolos de transformação genética já publicados, ou seja, com os dois processos já otimizados. No entanto, as informações da eficiência de regeneração não estão disponíveis nos mesmos. Portanto, os dados foram comparados, principalmente, com outros trabalhos de regeneração *in vitro* de trigo.

Alguns explantes foram perdidos por contaminação com fungos ou bactérias. Estes explantes foram omitidos nos cálculos de percentagem de formação de calos.

Os calos formados, tanto no protocolo D quanto no PK, apresentaram coloração translúcida a cremosa, com aspecto friável, originando-se a partir da região dos ferimentos (Fig. 1). Os calos embriogênicos provenientes de embriões imaturos normalmente apresentam características de coloração leitosa, friabilidade, primórdios foliares que tornam-se clorofilados poucos dias após a exposição à luz, além da desconexão dos vasos do xilema do embrião somático com o restante do calo. No presente trabalho, como os calos não apresentaram as

características macroscópicas acima descritas, a identificação da origem embriogênica ou organogênica das plântulas não ficou evidente. Este fato poderá ser verificado por análise histológica no futuro.

Foto: Elene Yamazaki Lau



Fig. 1. Calo proveniente de semente (embrião maduro) de trigo cultivar Bobwhite SH9826.

Todos os genótipos testados apresentaram capacidade de formação de calos, sendo que as médias observadas variaram de 83,3% (Bobwhite SH9826 – D) a 90,7% (MGS1-Aliança D) (Tabela 1). Não houve diferença significativa entre os tratamentos, ou seja, tanto a cultivar controle quanto BR18-Terena e MGS1-Aliança responderam semelhantemente em ambos os protocolos (Tabela 2).

Há vários relatos dos valores médios percentuais de indução de calos próximas a 90,0% para diversas cultivares de trigo a partir de sementes maduras (ÖZGEN et al., 1998; BI et al., 2007; HAN et al., 2007), inclusive no Brasil (NEIVERTH et al., 2010). Proporções menores também foram relatadas, variando entre 25,7% a 57,7% (CHEN et al., 2006; NASIRCILAR et al., 2006). Isto demonstra que, para esta característica, os resultados obtidos neste trabalho são satisfatórios e próximos aos limites superiores.

No entanto, para a característica calos com brotações (que poderiam originar plântulas), houve diferença estatística entre as respostas aos protocolos e para as cultivares (Tabela 3). As brotações (Fig. 2) foram observadas apenas nos calos formados no protocolo D, variando de 1,5% a 34,9% (Tabela 1). Bobwhite SH9826 e BR-18 não apresentaram diferença estatística, embora a primeira tenha a tendência de produzir maior número de calos com brotações (Tabela 4). MGS1-Aliança foi estatisticamente inferior a Bobwhite SH9826 neste quesito.

É possível que o tempo de incubação no escuro no protocolo PK tenha sido insuficiente para a indução e regeneração de calos embriogênicos, pois Patnaik et al. (2006), utilizando os mesmos meios de cultura, obtiveram média de 76,1% de formação de calos em três diferentes cultivares de trigo e regeneração de brotações média em 60,5% dos calos. Ou seja, a eficiência de regeneração, que representa o número de calos produzindo brotações por embrião utilizado como explante, foi de 46,0%. A descrição do protocolo em Patnaik; Khurana (2003) não é muito clara, o que pode ter provocado um equívoco nos procedimentos. A repetição do experimento poderia solucionar esta dúvida.

Foto: Elene Yamazaki Lau



Fig. 2. Plântulas provenientes de calos derivados de sementes (embrião maduro) de trigo cultivar Bobwhite SH9826.

Tabela 1. Formação de calos e regeneração *in vitro* de cultivares de trigo em dois diferentes protocolos.

Protocolo	Cultivar	% explantes com calos	% de calos com brotações	Eficiência de regeneração (%)
D ¹	Bobwhite SH9826	83,3±8,4 ^{3a}	34,9±21,7a	29,1
	BR18-Terena	90,0±13,2a	20,0±8,8a	18,0
	MGS1-Aliança	90,7±3,7a	1,5±3,4b	1,4
PK ²	Bobwhite SH9826	88,9±8,1a	0,0c	0,0
	BR18-Terena	86,7±5,4a	0,0c	0,0
	MGS1-Aliança	88,9±7,0a	0,0c	0,0

¹Protocolo derivado de Ding et al. (2009); ²protocolo derivado de Patnaik; Khurana (2003); ³média±desvio padrão. As médias contendo as mesmas letras, no sentido vertical, não diferem entre si ao nível de 5% de significância.

Exemplos de eficiências de regeneração relatadas em outros trabalhos são variáveis, sendo 48,6% (HAN et al., 2007), 15,0% (NEIVERTH et al., 2010), e valores médios provenientes de diferentes cultivares de 23,1%, 29,5%, 22,9% e 13,8% (NASIRCILAR et al., 2006; CHEN et al., 2006; BI et al., 2007). Portanto, para o protocolo D, a eficiência de regeneração é similar aos relatados utilizando como explante o embrião maduro. Se comparado com calos originários de embriões imaturos de Bobwhite SH9826 (eficiência de regeneração de 75%) (PELLEGRINESCHI et al., 2002), a eficiência de regeneração dos calos de embriões maduros ainda é muito inferior, embora não impossibilite a transformação genética.

Tabela 2. Análise de Desvios (ANODE) – indução de calos a partir de embriões maduros de três cultivares de trigo.

Modelo	GL ¹	Desvio	GL residual	Desvio residual	Valor P
Nulo (média)			34	32,860	
Cultivar	2	1,071	32	31,788	0,585
Protocolo	1	0,005	31	31,783	0,941
Cultivar x protocolo	2	1,790	29	29,993	0,409

¹Grau de liberdade. * significativo a $\alpha=0,05$

Tabela 3. Análise de Desvios (ANODE) – indução de brotações em calos provenientes de embriões maduros de três cultivares de trigo.

Modelo	GL ¹	Desvio	GL residual	Desvio residual	Valor P
Nulo (média)			34	155,156	
Protocolo	1	88,789	33	66,368	0,000*
Cultivar	2	18,998	31	47,370	0,040*
Cultivar x protocolo	2	8,511e-08	29	47,370	1,000

¹Grau de liberdade. * significativo a $\alpha=0,05$

Tabela 4. Coeficientes do modelo – indução de brotações em calos provenientes de embriões maduros de três cultivares de trigo.

	Estimado	Erro padrão	Estatística Z	Valor P
(Intercepto)	-11,510	0,326	-35,316	0,000*
Protocolo PK	-20,554	3187,841	-0,006	0,995
BR18-Terena	-0,503	0,539	-0,933	0,351
MGS1-Aliança	-2,808	1,693	-1,658	0,1

* significativo a $\alpha=0,05$. O protocolo D e a cultivar Bobwhite SH9826 são os padrões de comparação.

A maioria das brotações produzidas foram únicas, mas ocorreram explantes com duas e três brotações (Tabela 5). Este fato é desejável porque aumenta o número de brotações por calo e, conseqüentemente, a probabilidade de obter plantas transformadas. Não foi verificado se as multibrotações possuem a mesma origem celular ou se são originárias de diferentes células. A vantagem da produção de brotações múltiplas originadas de diferentes células é aumentar a probabilidade de obtenção de diferentes eventos de transformação genética. No caso de ser originária da mesma célula inicial, a vantagem seria ter clones do mesmo evento, diminuindo as chances de perda durante a aclimação. Tanto neste aspecto quanto na percentagem de calos com brotações, BR18-Terena foi comparável à Bobwhite SH9826 enquanto MGS1-Aliança apresentou valores inferiores (Tabelas 3, 4, 6 e 7), indicando que esta última é a menos indicada para ser submetida à transformação genética.

Tabela 5. Número de brotações em calos provenientes de embriões maduros de cultivares de trigo no protocolo D¹ de regeneração *in vitro*.

Cultivar	Número de calos			Brotações/ calo ²	Brotações/ embrião ³
	1 brotação	2 brotações	3 brotações		
Bobwhite SH9826	20	3	3	0,46a	0,39
BR18-Terena	9	4	2	0,31a	0,28
MGS1-aliança	1	0	0	0,02b	0,01

¹Protocolo proposto por Ding et al. (2009) modificado. ²Número total de brotações/número total de calos. ³Número total de brotações/número total de embriões, sendo este último estimado a partir da percentagem de formação de calos e número de calos restantes ao final do experimento, devido às perdas por contaminação.

Tabela 6. Análise de Desvios (ANODE) – número de brotações por calos provenientes de embriões maduros de três cultivares de trigo.

Causa de variação	GL ¹	Desvio	GL residual	Desvio residual	Valor P
Nulo(média)			8	53,326	
Cultivar	2	41,594	6	11,732	2,85e-05*

¹Grau de liberdade. * significativo a $\alpha=0,05$

Tabela 7. Coeficientes do modelo – número de brotações em calos provenientes de embriões maduros de três cultivares de trigo.

	Estimado	Erro padrão	Estatística t	P(> t)
(Intercepto)	2,457	0,238	10,310	0,000*
MGS1-aliança	-3,555	1,430	-2,487	0,047*
BR18-Terena	-0,420	0,378	-1,110	0,310

* significativo a $\alpha=0,05$. A cultivar Bobwhite SH9826 é o padrão de comparação.

Zale et al (2004) obtiveram uma média de 0,39 brotações/calos, 0,31 brotações/ embrião maduro, para 29 cultivares e linhagens de trigo. Neste trabalho, calos provenientes de embriões maduros de Bobwhite produziram 0,63 brotações/calos, enquanto que de embriões imaturos produziram 2,9 brotações/calos, evidenciando a superioridade do último explante. Já em Özgen et al (1998), foi obtida uma média de 0,26 brotações/calos e 0,23 brotações/embrião. Novamente, os resultados obtidos no presente trabalho encontram-se próximos e às vezes até superiores às médias de dados já relatados.

Conclusão

Vários são os fatores que afetam o estabelecimento de um protocolo de transformação genética de plantas, incluindo a dependência do genótipo, o tipo de explante e a repetibilidade de protocolos já publicados. Quanto ao material genético, BR18-Terena foi responsivo à regeneração *in vitro* de maneira similar a Bobwhite SH9826 utilizando o explante inicial embrião maduro. Foi obtida regeneração de plântulas somente no protocolo proposto por Ding et al. (2009) modificado e há suspeitas de problemas na interpretação dos procedimentos descritos por

Patnaik; Khurana (2003). Os resultados obtidos quanto ao percentual de explantes iniciais com formação de calos, calos com brotações e brotações por calo no presente trabalho são próximos e às vezes até superiores às médias de dados já relatados. Nesta situação, especialmente para BR18-Terena e Bobwhite SH9826, o processo de transformação genética não é impossibilitado. No entanto, os resultados são muito aquém se comparados com os de regeneração a partir do explante embrião imaturo. Portanto, seria interessante testar outros protocolos disponíveis na literatura, tal como Han et al. (2007) ou mesmo modificações nos utilizados neste trabalho (tais como variar o período de incubação no escuro, separar o embrião do endosperma, variar a concentração dos reguladores de crescimento, etc.) para tentar obter melhorias.

Referências bibliográficas

- BI, R. M.; KOU, M.; CHEN, L. G.; MAO, S. R.; WANG, H. G. Plant regeneration through callus initiation from mature embryo of *Triticum*. **Plant Breeding**, Berlin, v. 126, n. 1, p. 9-12, fev. 2007.
- CHEN, J.-Y., YUE, R.-Q., XU, H.-X.; CHEN, X.-J. Study on plant regeneration of wheat mature embryos under endosperm-supported culture. **Agricultural Sciences in China**, v. 5, n. 8, p. 572-578, ago. 2006.
- DING, L.; LI, S.; GAO, J.; WANG, Y.; YANG, G.; HE, G. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation conditions in mature embryos of elite wheat. **Molecular Biology Reports**, The Hague, v. 36, n. 1, p. 29-36, jan. 2009.
- DORNELLES, A. L. C.; CARVALHO, F. I. F.; FEDERIZZI, L. C.; HANDEL, C. L.; BERED, F.; SORDI, M. E. B.; SCHNEIDER, F. Callus induction and plant regeneration by Brazilian triticale and wheat genotypes. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 20, n. 1, mar. 1997. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-84551997000100008&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 29 jan. 2010.
- HAN, S.-N.; OH, P.-R.; KIM, H.-S.; HEO, H.-Y.; MOON, J. C.; LEE, S.-K.; KIM, K.-H.; SEO, Y.-W.; LEE, B.-M. Effects of antibiotics on suppression of *Agrobacterium tumefaciens* and plant regeneration from wheat embryo. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, Seoul, v. 10, n. 2, p. 92-98, jun. 2007.
- HANDEL, C. L.; FEDERIZZI, L. C.; BERED, F.; LANGE, C. E.; DORNELLES, A. L. C. Regeneration of isogenic lines of the Maringá genotype of wheat (*Triticum aestivum* L.) with short height genes (Rht₁ and Rht₂). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 25, n. 3, p. 367-370, mar./abr. 1995. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84781995000300005&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 29 jan. 2010.
- JONES, H. D. Wheat transformation: current technology and applications to grain development and composition. **Journal of Cereal Science**, London, v. 41, n. 2, p.137-147, mar. 2005.
- LEUNG, H. Stressed genomics – bringing relief to rice fields. **Current Opinion in Plant Biology**, Amsterdam, v. 11, n. 2, p. 201-208, abr. 2008.
- MILACH, S. C. K.; FEDERIZZI, L. C.; CARVALHO, F. I. F.; DORNELLES, A. L. C.; LANGE, C. Plant regeneration in callus culture of Brazilian wheat genotypes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 26, n. 11/12, p. 1947-1956, nov./dez. 1991.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, jul. 1962.
- NASIRCILAR, A. G.; TURGUT, K.; FISKIN, K. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of different wheat genotypes. **Pakistan Journal of Botany**, Faisalabad, v. 38, n. 3, p. 637-645, set. 2006.

NEIVERTH, A.; SILVA, J. B.; SCHUSTER, I.; SANTOS, M. F. D.; VENDRUSCOLO, E. C. G. Regeneration of wheat plants from wheat (*Triticum aestivum* L. cv CD104) mature embryos. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 11, n. 2, p. 101-108, mar./abr. 2010.

ÖZGEN, M.; TÜRET, M.; ALTINOK, S.; SANCAK, C. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. **Plant Cell Reports**, New York, v. 18, n. 3, p. 331-335, dez. 1998.

ÖZGEN, M.; TÜRET, M.; ÖZCAN, S.; SANCAK, C. Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos of winter durum wheat genotypes. **Plant Breeding**, Berlin, v. 115, n. 6, p. 455-458, dez. 1996.

PATNAIK, E.; KHURANA, P. Genetic transformation of Indian bread (*T. aestivum*) and pasta (*T. durum*) wheat by particle bombardment of mature embryo-derived calli. **BMC Plant Biology**, London, v. 3, n. 5, set. 2003.

PATNAIK, D.; VISHNUDASAN, D.; KHURANA, P. *Agrobacterium*-mediated transformation of mature embryos of *Triticum aestivum* and *Triticum durum*. **Current Science**, Bangalore, v. 91, n. 3, p. 307-317, ago. 2006.

PELLEGRINESCHI, A.; NOGUERA, L. M.; SKOVMAND, B.; BRITO, R. M.; VELAZQUEZ, L.; SALGADO, M. M.; HERNANDEZ, R.; WARBURTON, M.; HOISINGTON, D. Identification of highly transformable wheat genotypes for mass production of fertile transgenic plants. **Genome**, Ottawa, v. 45, n. 2, p. 421-430, abr. 2002.

THE R PROJECT for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing - R Development Core Team, 2010. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 29 jan. 2010. Na página a data que consta em propriedades é 2006. Verifique.

VENDRUSCOLO, E. C. G.; SCHUSTER, I.; NEGRA, E. S.; SCAPIM, C. A. Callus induction and plant regeneration by brazilian new elite wheat genotypes. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 8, n. 3, p. 195-201, maio 2008.

WITCOMBE, J. R.; HOLLINGTON, P. A.; HOWARTH, C. J.; READER, S.; STEELE, K. A. Breeding for abiotic stresses for sustainable agriculture. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, London, v. 363, n. 1492, p. 703-716, fev. 2008.

YU, Y.; WEI, Z. M. Influences of cefotaxime and carbenicillin on plant regeneration from wheat mature embryos. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 52, n. 3, p. 553-556. 2008.

ZALE, J. M.; BORCHARDT-WIER, H.; KIDWELL, K. K.; STEBER, C. M. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of a diverse set of wheat genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 76, n. 3, p. 277-281, mar. 2004.

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Sandra Maria Mansur Scagliusi
Membros: Anderson Santi, Douglas Lau (vice-presidente), Flávio Martins Santana, Gisele Abigail M. Torres, Joseani Mesquita Antunes, Maria Regina Cunha Martins, Martha Zavariz de Miranda, Renato Serena Fontaneli

Expediente

Referências bibliográficas: Maria Regina Martins
Editoração eletrônica: Márcia Barrocas Moreira Pimentel

YAMAZAKI LAU, E.; MORÁS, A.; NICOLAU, M.; SCAGLIUSI, S. M. M.; GRANDO, M. F.; SÓ E SILVA, M. **Indução de calos e regeneração *in vitro* de cultivares de trigo a partir de embriões maduros visando a transformação genética.** . Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2010. 17 p. html. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 125). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do125.htm>.