

INDUÇÃO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM CANA-DE-AÇÚCAR RB935744

Rodrigo de Oliveira Almeida¹
Sérgio Delmar dos Anjos e Silva²
Daiane Peixoto Vargas³
Leonardo Ferreira Dutra⁴

Resumo

O objetivo, com este trabalho, foi avaliar a resposta morfogênica do genótipo RB935744 à indução de embriogênese somática com subsequente regeneração dos embriões. Segmentos transversais de folhas jovens medindo 2-3 mm de espessura foram cultivados em meio MS sólido contendo três diferentes concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) para indução de calos embriogênicos. Os melhores resultados foram obtidos usando $31,5 \mu\text{M L}^{-1}$ de 2,4-D em 45 ou 60 dias de incubação em meio de indução, realizando de um a três subcultivos e incubando em meio de regeneração por período de 15 a 45 dias. Esse resultado mostra que o protocolo de embriogênese somática para o genótipo RB935744 necessita de ajustes para se alcançar uma satisfatória produção de embriões somáticos.

Palavras-chave: *Saccharum* spp. Cultura de tecido vegetal. Regeneração *in vitro*.

1 Introdução

A cana-de-açúcar está presente em vários países, sendo plantada em larga escala comercial nos trópicos e sub-trópicos (COSTA-LIMA et al., 2001). O Brasil é o líder mundial no uso desta espécie como fonte renovável de energia e na exportação de açúcar (CONAB, 2011). Atualmente observa-se uma intensificação dos trabalhos desta cultura nos programas de melhoramento vegetal devido a sua importância econômica. A cana-de-açúcar tem uma alta eficiência na produção de biomassa e é capaz de adaptar-se a diferentes condições ambientais. Atualmente é uma das principais espécies em estudo, devido ao aumento do plantio em novas áreas (MOLINARI et al., 2007; PAPINI-TERZI et al., 2009).

A crescente realização de trabalhos com cultura de tecido de cana-de-açúcar mostra que é possível produzir em larga escala mudas sadias, complementando a propagação comercial desta cultura em vários países, como Brasil, Estados Unidos, Índia e Cuba (LAKSHMANAN et al., 2006). Contudo, necessita-se de um eficiente protocolo de cultura de tecidos para obter uma alta produção de plantas (DESAI et al., 2004).

O genótipo RB935744, desenvolvido pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), tem como principais características o rápido desenvolvimento, hábito de crescimento ereto, tolerante ao carvão e à ferrugem marrom, resistência intermediária ao mosaico e resistente à escaldadura, alta produtividade, material rústico e de excelente sanidade (RIDESA, 2010).

A propagação *in vitro* pode ser realizada por organogênese ou embriogênese somática (LAKSHMANAN et al., 2006), utilizando a cultura de folhas imaturas (KHAN et al., 2009; RAMGAREEB et al., 2010), cultura de calos (RASHID et al., 2009; ATHER et al., 2009) e cultura de meristema (BURNER; GRISHAM, 1995). Programas de transformação genética vêm utilizando a cultura de calos de cana-de-açúcar como materiais de trabalho (SANTOSA et al., 2004; JOYCE et al., 2010; BASNAYAKE et al., 2011).

¹MSc. em Biotecnologia Vegetal, Departamento de Agricultura e Ambiente. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais - Câmpus Rio Pomba.

²Pesquisador, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais. Embrapa Clima Temperado.

³Pós-Doutoranda, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais. Embrapa Clima Temperado.

⁴Pesquisador, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais. Embrapa Clima Temperado.

Objetivou-se, com o presente trabalho, avaliar a resposta morfogênica de cana-de-açúcar (cultivar RB935744) à indução de embriogênese somática e sua consequente regeneração.

2 Material e métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, da Embrapa Clima Temperado. O genótipo RB935744, cultivado no campo experimental da Embrapa Clima Temperado, foi utilizado para este experimento. Os ápices das plantas com oito e nove meses de idade foram coletados no campo de produção (maio de 2011), fornecendo o explante a ser utilizado. As folhas externas foram retiradas e as folhas jovens foram lavadas com água estéril. Em condições assépticas, as folhas jovens foram desinfestadas com etanol 70% por um minuto e solução de hipoclorito de sódio 2,5% por 15 minutos. Adicionalmente, mais folhas foram retiradas, permanecendo a fonte de explante com aproximadamente 1 cm de diâmetro. Logo acima do meristema apical, segmentos transversais de 2-3 mm de espessura foram seccionados, gerando os explantes a serem utilizados. Foram seccionados 15 explantes por ápice para todo experimento.

O meio de indução utilizado neste experimento foi constituído dos sais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) contendo 20 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar, 100 mg L⁻¹ de myo-inositol, 100 mg L⁻¹ de PVP, 0,5 mg L⁻¹ de ácido nicotínico, 0,15 mg L⁻¹ de ácido cítrico, 1 mg L⁻¹ de tiamina, 50 mg L⁻¹ de cisteína, 2 mg L⁻¹ de glicina, 50 mg L⁻¹ de arginina, 0,5 mg L⁻¹ de piridoxina e 50 mL L⁻¹ água de coco (MSC3) (HEINZ; MEE, 1969). Três concentrações do regulador de crescimento 2,4-D (ácido 2,4- diclorofenoxiacético) (4,5, 13,5 e 31,5 μM L⁻¹) foram utilizadas. O pH do meio de indução foi ajustado para 5,7 ± 0,1 antes da autoclavagem. Os explantes foram colocados em frascos de 250 mL (contendo 20 mL de meio de indução), selados com tampas de polipropileno e incubados a 26 ± 1 °C sob ausência de luz. Os tratamentos consistiam de 12 repetições (total de 36 unidades experimentais por tratamento), contendo seis explantes cada repetição (total de 216 explantes por tratamento). Respostas morfogênicas dos explantes foram avaliadas em três diferentes tempos (30, 45 e 60 dias).

O meio de regeneração utilizado foi composto sais MS contendo 20 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar, 100 mg L⁻¹ de myo-inositol e 100 mL L⁻¹ de água de coco. O pH do meio de regeneração foi ajustado para 5,7 ± 0,1 antes da autoclavagem. Aos 45 dias, os calos embriogênicos provenientes do meio de indução de embriogênese somática foram individualizados dos explantes e transferidos para um novo meio de indução (primeiro subcultivo). Após 21 dias e 42 dias, realizou-se o segundo e terceiro subcultivo, respectivamente. Ao final de cada subcultivo (1º, 2º e 3º subcultivos), os calos embriogênicos subcultivados foram transferidos para o meio de regeneração. A resposta morfogênica de regeneração foi avaliada em três diferentes tempos (15, 30 e 45 dias). Cada tratamento consistiu de três repetições, sendo cada repetição contendo quatro amostras de calos embriogênico (aproximadamente 4 mm² cada amostra) coletadas ao acaso, totalizando setenta e duas amostras para cada tratamento.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial duplo (concentração x tempo) para o experimento de indução de calos embriogênicos e em esquema fatorial triplo (subcultivo x tempo x concentração) para o experimento de regeneração dos embriões somáticos. Cada experimento foi repetido três vezes.

Os dados coletados foram transformados ($\arcsen\%/100$) e a homogeneidade das variâncias e normalidades dos dados foram verificados com o teste de Levene e Shapiro-Wilk, respectivamente. Uma vez atendidos os pressupostos estatísticos, os dados foram analisados por ANOVA ($p < 0,05$) para as variáveis formação de calos embriogênicos e regeneração dos embriões somáticos. Submeteram-se ainda os dados ao teste de Tukey ao nível de significância de 5% e as representações médias dos tratamentos foram apresentadas em gráficos, utilizando o *software* estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2009).

Resultados e discussão Após o preparo do material vegetal, segmentos transversais (2-3 mm) foram colocados em meio de indução. Aos 21 dias observou-se resposta morfogênica (início de formação de calos) dos explantes no genótipo em estudo (RB935744) nos três tratamentos (4,5, 13,5 e 31,5 μM L⁻¹ de 2,4-D).

A análise de variância ($p < 0,05$) da variável resposta indução de calos embriogênicos mostrou que houve diferença significativa no tempo e na concentração utilizada do fitorregulador 2,4-D para indução de

calos embriogênicos. Contudo, não houve diferença significativa entre a interação tempo e concentração (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo da análise de variância com soma de quadrados, quadrados médios, F calculado, p-value e coeficiente de variação (CV%), da variável indução de calos embriogênicos. Pelotas, RS. Embrapa CPACT, 2011.

Fatores	GL	SQ	QM	Fc	p-value
Tempo	2	2,2020	1,1010	11,444	0,000034 **
Concentração	2	7,7109	3,8554	40,074	0,000000 **
Tempo x Concentração	4	0,4750	0,1187	1,234	0,301296
Resíduos	99	9,5246	0,0962		
Total	107				
CV (%) = 68,75					

Fonte: Elaboração do autor.

A produção de calos embriogênicos em relação às três concentrações de 2,4-D testadas (independente do tempo de incubação) obteve melhores resultados utilizando $31,5 \mu\text{M L}^{-1}$ de 2,4-D em meio de indução (49,4%). Para as concentrações de 4,5 e $13,5 \mu\text{M L}^{-1}$, houve produção de 4,7 e 25,9% de calos embriogênicos, respectivamente (Figura 1). Para a produção de calos embriogênicos ao longo do tempo (independente da concentração de 2,4-D), os melhores resultados foram obtidos aos 45 e 60 dias de incubação em meio de indução (30,5 e 36,9%, respectivamente). Para o tempo de 30 dias, a produção de calos embriogênicos alcançou uma taxa de 12,5% (Figura 2).

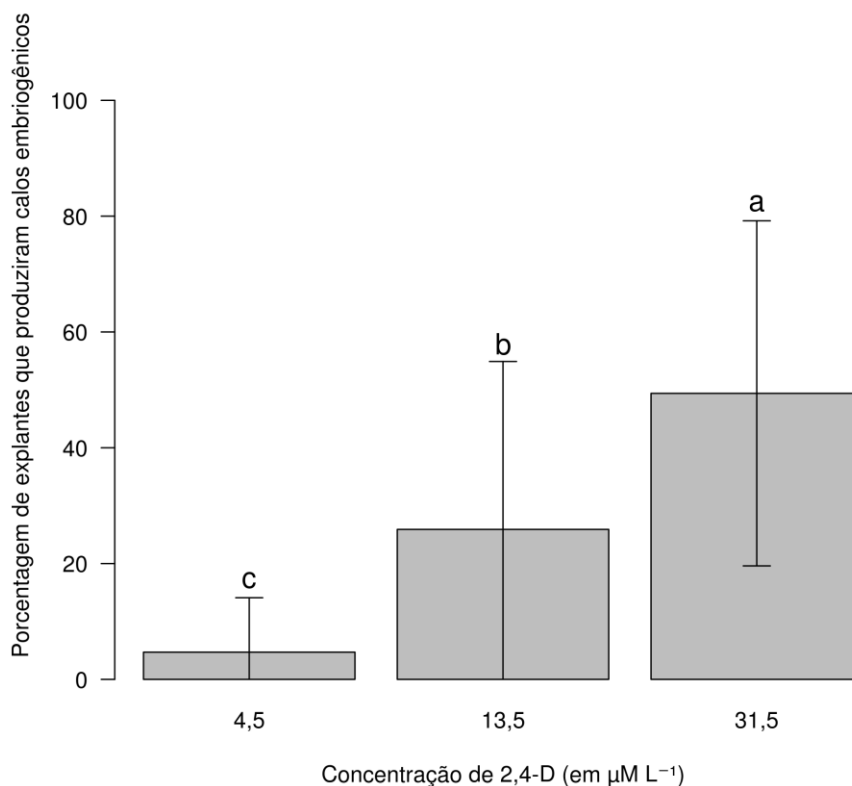


Figura 1. Efeito das diferentes concentrações do fitoregulador 2,4-D em meio de indução na produção de calos embriogênicos em cana-de-açúcar (cultivar RB935744). Comparação das médias de explantes que produziram calos embriogênicos em função da concentração de 2,4-D. Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente entre si (Tukey, $p < 0,05$).

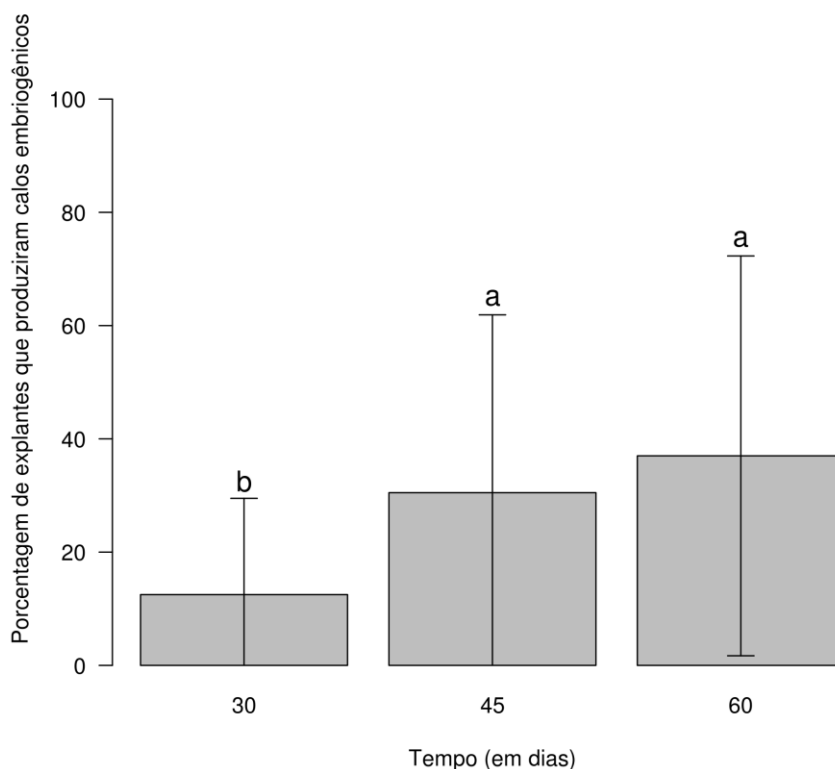


Figura 2. Efeito dos diferentes tempos de incubação em meio de indução suplementado com fitorregulador 2,4-D na produção de calos embriogênicos em cana-de-açúcar (cultivar RB935744). Comparação das médias de explantes que produziram calos embriogênicos em função do tempo de incubação em meio de indução. Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente entre si (Tukey, $p < 0,05$).

Devido à presença do regulador de crescimento 2,4-D nos três tratamentos, houve a formação de calos embriogênicos, ao passo que este processo não ocorreu no controle negativo (meio basal sem 2,4-D). Dibax et al. (2011) relatam resultados similares ao estudar a indução de embriogênese somática nas cultivares de cana-de-açúcar RB931003 e RB98710. A embriogênese primária em cana-de-açúcar é exclusivamente induzida em meio de cultura contendo auxinas (RAEMAKERS et al., 1995) e, segundo Grattapaglia e Machado (1990), as auxinas são essenciais para induzir a formação de calos. O regulador de crescimento 2,4-D é amplamente utilizado na indução de calos e embriões somáticos, contudo, quando aplicado em concentrações elevadas, os calos se apresentam com um aspecto mais mucilaginoso (HO; VASIL, 1983).

Os resultados contidos neste trabalho mostram com clareza que a formação de calos embriogênicos relaciona-se diretamente com a concentração do fitorregulador 2,4-D e o tempo de incubação no meio de indução, apresentando assim diferentes taxas de produção de calos embriogênicos. Esses resultados corroboram o que já foi mostrado por Ho e Vasil (1983) e Desai et al. (2004), sendo que estes últimos descrevem esse fenômeno no genótipo CoC-671, plantada na Índia.

Após 45 dias em meio de indução, os calos produzidos pelos explantes foram individualizados e transferidos para um novo meio de indução (1º subcultivo). Após 21 dias e 42 dias, realizou-se o segundo e terceiro subcultivo, respectivamente. A resposta morfogênica de regeneração foi avaliada ao final de cada subcultivo e em três diferentes tempos (15, 30 e 45 dias).

A análise de variância ($p < 0,05$) da variável resposta regeneração de embriões somáticos mostrou que não houve diferença significativa para a regeneração dos embriões somáticos em relação ao tempo de incubação em meio de regeneração, quanto ao número de subcultivos e em relação aos embriões somáticos provenientes das diferentes concentrações de 2,4-D no meios de indução, assim como também não houve diferença estatística significativa para as interações destes fatores (Tabela 2).

Tabela 2. Resumo da análise de variância com soma de quadrados, quadrados médios, F calculado, p-value e coeficiente de variação (CV%), da variável regeneração de embriões somáticos. Pelotas, RS. Embrapa CPACT, 2011.

Fatores	GL	SQ	QM	Fc	p-value
Subcultivo	2	0	0	1	0,3779
Tempo	2	0	0	1	0,3779
Concentração	1	0	0	1	0,3240
Subcultivo x Tempo	4	0	0	1	0,4203
Subcultivo x Concentração	2	0	0	1	0,3779
Tempo x Concentração	2	0	0	1	0,3779
Subcultivo x Tempo x Concentração	4	0	0	1	0,4203
Resíduos	36	0	0		
Total	53				
CV (%) = 0,0					

Fonte: Elaboração do autor.

Este resultado da análise de variância já era esperado, uma vez que todos os tratamentos obtiveram uma taxa de 100% de regeneração dos embriões somáticos.

De acordo com os resultados de indução de embriogênese somática e sua subsequente regeneração apresentados neste trabalho, pode-se notar que a maior produção de calos embriogênicos do genótipo RB935744 foi obtido com $31,5 \mu\text{M L}^{-1}$ de 2,4-D (49,4 %), com uma taxa de 100% regeneração. Semelhantes resultados são relatados por Dibax et al. (2011), onde obtiveram taxas de 75% a 80% de regeneração de embriões somáticos das cultivares RB98710 e RB931003, respectivamente. Apesar de haver alcançado taxas de 100% de regeneração de embriões somáticos, ajustes no protocolo de indução de embriogênese somática são necessários, de modo a obter maiores quantidades de material a serem regenerados e com isso aumentar a eficiência deste protocolo de micropropagação de cana-de-açúcar (cultivar RB935744).

Calos embriogênicos provenientes do meio de indução contendo $4,5 \mu\text{M L}^{-1}$ de 2,4-D não se desenvolveram na fase de subcultivo, oxidando-se em poucos dias após a individualização e consequentemente sendo retirados da avaliação de regeneração de embriões.

A ocorrência desse fato pode ser explicado com base em estudos prévios. De acordo com Ho e Vasil (1983), na regeneração de brotos proveniente de embriões somáticos, a sacarose pode influenciar a diferenciação celular e no desenvolvimento das raízes. Segundo Litz e Gray (1995), outro fator importante nesse processo é o uso de complexos orgânicos e aminoácidos essenciais no meio de regeneração. Raemakers et al. (1995A) também relatam que insuficiência na maturação dos embriões somáticos acarreta em desenvolvimento não satisfatório na produção de brotos. Esse fenômeno é chamado de germinação precoce e é o principal problema no desenvolvimento de embriões somáticos (LITZ; GRAY, 1995).

O uso de água de coco, que contém citocininas naturais, em meio de regeneração promove efeitos benéficos à morfogênese e desenvolvimento do broto (GEORGE et al., 2008). Entretanto, a concentração dos compostos da água de coco não são constantes nos frutos, ou mesmo nos produtos industrializados, podendo assim levar a variações na taxa de regeneração de embriões somáticos. Contudo, no presente trabalho não houve variação na taxa de regeneração, podendo ser explicado pela utilização de água de coco proveniente de produto industrializado pertencente a um único lote de fabricação.

Sob ausência de auxina no meio de regeneração, os brotos regenerados provenientes de embriões somáticos foram produzidos neste experimento, assim como os trabalhos de Falco et al. (2000) e Snyman et al. (2006). Visando obter plantas bem desenvolvidas, os brotos regenerados foram subcultivados novamente em meio de regeneração por 21 dias. De acordo com a literatura, a aclimatização de plantas regeneradas *in vitro* obtém maior sucesso quando estas plantas são cultivadas em ambientes com alta umidade e uso de substratos de composição simples (DIBAX et al., 2011). Sendo assim, as plantas obtidas neste trabalho foram transferidas para recipientes de polipropileno contendo vermiculita autoclavada, irrigadas com MS líquido e aclimatadas em casa de vegetação, para posterior plantio no campo.

3 Conclusões

A micropropagação do genótipo RB935744 por embriogênese somática e posterior regeneração dos embriões somáticos mostrou melhores resultados ao incubar os explantes por período de 45 a 60 dias em meio de indução contendo $31,5 \mu\text{M L}^{-1}$ de 2,4-D, podendo realizar de um a três subcultivos e incubando por período de 15 a 45 dias em meio de regeneração, gerando assim 49,4% de calos embriogênicos e 100,0% de regeneração destes embriões somáticos.

As informações aqui descritas neste protocolo estudado podem ser utilizadas na regeneração desta cultivar, podendo auxiliar os programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar. Contudo, se fazem necessários ajustes para melhorar a fase de indução da embriogênese somática, de modo a obter uma maior produção de embriões somáticos para posterior regeneração.

4 Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Financiadora de Estudos e Projetos (Finep), pelo apoio financeiro.

Somatic embryogenesis induction in sugarcane RB935744

Abstract

The aim of this study was to evaluate the morphogenic response to somatic embryogenesis and somatic embryos regeneration for genotype RB935744. Transversal segments of young leaf rolls with 2-3 mm size were used on solid MS medium supplemented with different concentrations of 2,4 - dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) for embryogenic callus induction. Better results were obtained using $31,5 \mu\text{M L}^{-1}$ of 2,4-D in 45 or 60 days of incubation on induction medium, one to three subcultures and incubating on regeneration medium for 15 to 45 days. This results show that somatic embryogenic protocol to genotype RB935744 must be adjusted for obtain a satisfactory somatic embryos production.

Keywords: *Saccharum* spp. Plant tissue culture. *In vitro* regeneration.

Referências Bibliográficas

ATHER, A.; et al. Optimization of the protocols for callus induction, regeneration and acclimatization of sugarcane cv. Thatta-10. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, n. 2, p. 815-820, 2009.

BASNAYAKE, S. W. V.; MOYLE, R.; BIRCH, R.G. Embryogenic callus proliferation and regeneration conditions for genetic transformation of diverse sugarcane cultivars. **Plant Cell Reports**, v. 30, n. 3, p. 439-448, 2011.

BURNER, D.M.; GRISHAM, M. P. Induction and stability of phenotypic variation in sugarcane as affected by propagation procedure. **Crop Science**, v. 35, n. 3, p. 875-880, 1995.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Central de informações agropecuárias: safras – cana**. São Paulo: CONAB, 2010. Disponível em: <www.conab.gov.br>. Acesso em: 17 fev. 2011.

- 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**, v. 24, n. 1, 2001.
- DIBAX, R.; et al. Plant regeneration of sugarcane cv. RB931003 and RB98710 from somatic embryos and acclimatization. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, n.3, p. 32-37, 2011.
- DESAI, N. S.; SUPRASANNA, P.; BAPAT, V. A. Simple and reproducible protocol for direct somatic embryogenesis from cultured immature inflorescence segments of sugarcane (*Saccharum* spp.). **Current Science**, v. 87, n. 6, p. 764-768, 2004.
- FALCO, M. C.; TULMANN NETO, A. T.; ULIAN, E. C. Transformation and expression of a gene for herbicide resistance in Brazilian sugarcane. **Plant Cell Reports**, v. 19, n. 12, p. 1188-1194, 2000.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3. ed. Amsterdam: The Background Springer, 2008, v. 1, 501p.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Orgs.). **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA – CNPH, 1990, p. 99-169.
- HEINZ, D. J.; MEE, G. W. P. Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. **Crop Science**, v. 9, n. 3, p. 346-348, 1969.
- HO, W. J.; VASIL, I. K. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) I. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. **Protoplasma**, v. 118, n. 3, p. 169-180, 1983.
- JOYCE, P.; et al. Selection system and co-cultivation medium are important determinants of *Agrobacterium* mediated transformation of sugarcane. **Plant Cell Report**, v. 29, n. 2, p. 173-183, 2010.
- KHAN, I. A.; et al. Direct regeneration of sugarcane plantlets: a tool to unravel genetic heterogeneity. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, n. 2, p. 797-814, 2009.
- LAKSHMANAN, P.; et al. Development and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. Interspecific hybrids) leaf culture. **Plant Cell Report**, v. 25, n. 10, p. 1007-1015, 2006.
- LITZ, R. E.; GRAY, D. J. Somatic embryogenesis for agricultural improvement. **World journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 11, n. 4, p. 416-425, 1995.
- MOLINARI, H. B. C.; et al. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, v. 130, n. 2, p. 218–229, 2007.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- PAPINI-TERZI, F.S.; et al. Sugarcane genes associated with sucrose content. **BMC Genomics**, v. 10, n. 120, p. 1-21, 2009.
- R FOUNDATION FOR STATISTICAL COMPUTING. **R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria, 2009. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 20 fev. 2011.

RAEMARKERS, C. J. J. M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. **Euphytica**, v. 81, n. 1, p. 93-107, 1995.

RAMGAREEB, S.; et al. Elimination of virus and rapid propagation of disease-free sugarcane (*Saccharum* spp. cultivar NCo376) using apical meristem culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 100, n. 2, p. 175-181, 2010.

RASHID, H.; et al. Callus induction and regeneration in elite sugarcane cultivar hsf-240. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, n. 4, p. 1645-1649, 2009.

REDE INTERUNIVERSITÁRIA PARA DESENVOLVIMENTO DO SETOR SUCROALCOOLEIRO (RIDESA). **Catálogo nacional de variedades "RB" de cana-de-açúcar**. Curitiba: Rede Interuniversitária para Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro, 2010. 80p.

SANTOSA, D. A.; et al. A rapid and highly efficient method for transformation of sugarcane callus. **Molecular Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 113-119, 2004.

SNYMAN, S. J.; et al. Refining the application of direct embryogenesis in sugarcane: effect of the developmental phase of leaf disk explants and the timing of DNA transfer on transformation efficiency. **Plant Cell Report**, v. 25, n. 10, p. 1016-1023, 2006.

Histórico Editorial

Recebido em: 01/12/2013

Aceito em: 20/03/2014