

# Embriogênese somática da cultivar RB966928 e do clone RB986419 de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)

## Somatic embryogenesis of cultivar RB966928 and clone RB986419 of sugarcane (*Saccharum* spp.)

Clarissa de Souza Mudry<sup>1\*</sup>; Diego Kyochi Katayama de Souza<sup>2</sup>; Roberson Dibax<sup>3</sup>; Giovana Bomfim de Alcântara<sup>3</sup>; João Carlos Bessalho Filho<sup>4</sup>

### Resumo

A cana-de-açúcar é uma cultura muito plantada devido a sua grande importância econômica, provenientes de seus produtos, etanol e açúcar. O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de açúcar, sendo assim a cultura está frequentemente inserida em programas de melhoramento genético. A transformação genética é estratégia para obtenção de cultivares resistentes e produtivas. Para obtenção de plantas transgênicas são necessários protocolos definidos e otimizados de regeneração *in vitro*. O objetivo desse trabalho foi avaliar a influência de diferentes concentrações de 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxyacético) para obtenção de calos embriogênicos na cultivar RB966928 e no clone RB986419. Folhas imaturas, de plantas com 10 meses de idade, foram utilizadas como fonte de explantes. Cilindros foliares de 8 x 150 mm, segmentados em 4 mm, foram inoculados em meio de cultura MS com cinco concentrações de 2,4-D (1, 3, 9, 16 e 27 µM). Um segundo experimento foi realizado com as concentrações de 3, 9 e 16 µM de 2,4-D. Para os dois experimentos, a desdiferenciação do material ocorreu no escuro. Os calos foram transferidos após 45 dias de subcultivo para novo meio de cultura, com as mesmas concentrações de origem para sua multiplicação. A cultivar RB966928 teve respostas de embriogênese somática de 30 e 41% utilizando 16 µM de 2,4-D para o primeiro e segundo experimentos, respectivamente. O clone RB986419 apresentou, respectivamente, 26 e 80% de formação de calos embriogênicos, utilizando-se 9 µM de 2,4-D no primeiro e segundo experimento. Os calos formados foram transferidos para meio MS sem regulador de crescimento vegetal. As plântulas formadas foram aclimatizadas e colocadas em casa de vegetação. As melhores concentrações de 2,4-D para a formação de calos embriogênicos foram 16 µM para a cv. RB966928 e 9 µM para o clone RB986419.

**Palavras-chave:** Calos embriogênicos, 2,4-D, cultivo *in vitro*

### Abstract

The sugar cane is a crop widely planted because of the economic importance of its products, sugar and ethanol. Brazil is the largest producer and exporter of sugar, so the crop is often inserted in breeding programs. Genetic transformation strategy is used to obtain resistant and productive cultivars. Defined and optimized *in vitro* regeneration protocols are required to obtain transgenic plants. The aim of this study was to evaluate the influence of different concentrations of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) to obtain embryogenic callus on cultivars RB966928 and RB986419 clone. Immature leaves from

<sup>1</sup> Discente de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Agronomia, Produção Vegetal, Deptº de Fitotecnia e Fitossanitarismo, DFF, Setor de Ciências Agrárias, SCA, Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, PR. E-mail: clamudry@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Discente de Agronomia, SCA, UFPR, Curitiba, PR. E-mail: souza702@hotmail.com

<sup>3</sup> Pós-Doutorandos do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Produção Vegetal, DFF, SCA, UFPR, Curitiba, PR. E-mail: robersondibax@hotmail.com; giobomfim@hotmail.com

<sup>4</sup> Prof. Dr., Programa de Pós-graduação em Agronomia, Produção Vegetal, DFF, SCA, UFPR, Curitiba, PR. E-mail: bespa@ufpr.br

\* Autor para correspondência

10 months old plants were used as a source of explants. Leaf 8 x 150 mm cylinders, segmented into 4 mm were inoculated on MS medium with five concentrations of 2,4-D (1, 3, 9, 16 and 27  $\mu\text{M}$ ). A second experiment was conducted with concentrations 3, 9 and 16  $\mu\text{M}$  of 2,4-D. For both experiments, the dedifferentiation occurred in the dark. Calli were transferred after 45 days of subculture to new medium with the same concentrations of origin for their multiplication. The cultivar RB966928 had responses to somatic embryogenesis of 30 and 41% using 16  $\mu\text{M}$  of 2,4-D for the first and second experiments, respectively. The clone RB986419 showed respectively 26 and 80% formation of embryogenic callus, using 9  $\mu\text{M}$  of 2,4-D in the first and second experiment. The calli were transferred to MS medium without plant growth regulator. Seedlings were acclimatized and placed in a greenhouse. The best concentrations of 2,4-D for the formation of calli were 16  $\mu\text{M}$  for the cultivar RB966928 and 9  $\mu\text{M}$  for clone RB986419.

**Keys words:** Embryogenic callus, 2,4-D, *in vitro* culture

## Introdução

A cana-de-açúcar é uma cultura de regiões tropicais e subtropicais e está entre as culturas mais plantadas no mundo, devido aos seus principais produtos: o açúcar e o etanol. O Brasil é o maior produtor e exportador de açúcar, possuindo na safra 2010/2011 uma área plantada aproximada de 8.056 mil hectares e produção de 623.905 mil toneladas de cana moída (CONAB, 2011).

Programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar visam a obtenção de plantas com elevada produtividade e resistentes a estresses bióticos e abióticos (GARCIA et al., 2007). Alguns clones e cultivares tem se destacado no campo. O clone RB986419, que possui características de campo para maturação de meio de safra, é tido como um clone promissor, pois possui elevada produtividade e riqueza agrícola, estando em fase de testes pela UFPR e se destacando pelo elevado teor de açúcar (RIDESA, 2009). A cultivar RB966928, foi lançada em 2010 pela UFPR, possui ciclo de maturação precoce e elevada sanidade às principais doenças, excelente adaptabilidade fenotípica e brotação, e vem sendo muito plantado nos estados de São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul (RIDESA 2010).

A transformação genética é uma estratégia para se obter cultivares mais resistentes e produtivos (LOPES; NASS; MELO, 2005). Para isso, são necessários protocolos bem definidos e otimizados de regeneração *in vitro* de plantas (DESAI; SUPRASANNA; BAPAT, 2004). Na cana-de-açúcar

a resposta morfogênica é fortemente influenciada pelo genótipo, conseqüentemente é necessário que os protocolos sejam adaptados para cada cultivar (JOYCE et al., 2010). Em cana-de-açúcar, a rota morfogênica mais estudada e utilizada para regeneração de plantas é a embriogênese somática (LAKSHMANAN, 2006), que pode ocorrer de forma direta ou indireta, conforme a idade fisiológica ou tipo de explante utilizado (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999; GUERRA; NODARI, 2006). A indução da embriogênese somática pode ser influenciada por vários fatores tais como: temperatura, luminosidade, meio de cultura e reguladores de crescimento vegetal e tipos de explantes (TAYLOR; DUKIC, 1993; BRISIBE et al., 1994; FALCO et al., 1996; LIMA et al., 2001; CHENGALRAYAN; GALLO-MEAGHER, 2005; GUERRA; NODARI, 2006; GARCIA et al., 2007; WATT et al., 2009; JOYCE et al., 2010).

Em cana-de-açúcar, os explantes para a formação de calos embriogênicos são retirados de folhas jovens, próximos ao meristema (TAYLOR et al., 1993; LAKSHMANAN et al., 2006; MOLINARI, 2006; GARCIA et al., 2007; JOYCE et al., 2010), que possuam de 6 a 15 meses (MARCANO et al., 2002; GILL; MALHTRA; GOSAL, 2006). Alguns pesquisadores afirmam que a utilização de sementes (CHENGALRAYAN; GALLO-MEAGHER, 2005) e palmitos com formação de inflorescência são fontes eficientes de explantes para a obtenção de calos embriogênicos (DESAI; SUPRASANNA; BAPAT, 2004; SNYMAN et al., 2006), e maior

regeneração de plântulas (GILL; MALHTRA; GOSAL, 2006). Franklin et al. (2006), utilizando segmentos da bainha de folhas de cana-de-açúcar, conseguiram calos embriogênicos e plântulas.

Vários autores relatam que calos embriogênicos de cana-de-açúcar são formados com a adição de auxinas sintéticas no meio de cultura (HO; VASIL, 1983; TAYLOR; DUKIC, 1993; GANDONOU et al., 2005; LAKSHMANAN, 2006), dentre eles estão o Dicamba (GANDONOU et al., 2005; GAJ, 2004; JIMÉNEZ, 2005), Picloran (CHENGALRAYAN; GALLO-MEAGHER, 2005; GARCIA et al., 2007) e 2,4-D (BLANCO et al., 1997; NIEVES et al., 2003; GANDONOU et al., 2005; LAKSHMANAN et al., 2006; WATT et al., 2009). Porém, a manutenção prolongada e os repetidos subcultivos podem causar uma instabilidade genética (GILL; MALHTRA; GOSAL, 2006) e aumentar a probabilidade de variação somaclonal (BURNER; GRISHAM, 1995; FRANKLIN et al., 2006; LAKSHMANAN et al., 2006), afetando o potencial embriogênico em cana-de-açúcar.

Este trabalho teve por objetivo avaliar a influência de diferentes concentrações de 2,4-D na obtenção de calos embriogênicos a partir de explantes foliares da cultivar RB966928 e no clone RB986419.

## Material e Métodos

### *Local de realização, origem do material e assepsia*

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Micropropagação de Plantas, do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Foram utilizados como explantes folhas imaturas do clone RB986419, e da cultivar RB966928, de plantas de cana-de-açúcar. As plantas estavam com aproximadamente 10 meses de idade, provenientes da Estação Experimental de Paranavaí, no município de Paranavaí, estado do Paraná.

O experimento foi realizado em duas etapas. Para o primeiro teste, os palmitos foram colhidos em outubro de 2009 para ambos os genótipos. O segundo experimento foi realizado com material vegetal retirado do campo no mês de fevereiro (RB986419) e maio de 2010 (RB966928).

Foram retiradas as folhas externas e a ponteira para a obtenção dos cilindros iniciais, de aproximadamente 10 mm de diâmetro e 15 cm de comprimento. A desinfestação dos palmitos foi realizada em câmara de fluxo vertical, com três lavagens com água deionizada estéril, um min em álcool 70%, 20 min em hipoclorito de sódio a 2% com duas gotas de detergente neutro líquido seguido por três enxágues com água deionizada estéril. As pontas e folhas externas foram retiradas, permanecendo um cilindro interno de 0,8 X 10 cm. Os explantes foram padronizados com aproximadamente 8 mm de diâmetro e 4 mm de comprimento.

### *Meio de indução e condições de cultura in vitro*

No primeiro experimento, o meio de cultura utilizado foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com cinco concentrações da auxina 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D): 1, 3, 9, 16 e 27  $\mu\text{M}$ . Para o segundo experimento, utilizou-se o meio MS com as concentrações de 3, 9 e 16  $\mu\text{M}$  de 2,4-D. Todos os meios foram suplementados com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 7 g L<sup>-1</sup> de ágar e o pH ajustado para 5,8  $\pm$  0,1. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121 °C, 1,5 atm por 20 min.

Foram utilizados frascos com capacidade para 200 mL, com tampa de polipropileno, contendo 50 mL de meio de cultura em cada frasco. Para cada concentração de 2,4-D foram utilizados 10 frascos, com 5 explantes por frasco. Os experimentos foram colocados em sala de crescimento, no escuro, com temperatura de 25 °C  $\pm$  2 °C, por 40 dias para primeiro experimento e 30 dias para o segundo.

Foram avaliados, aos 40 dias para o primeiro experimento e aos 30 dias para o segundo experimento, a formação de calos embriogênicos, calos não embriogênicos e a oxidação dos explantes. Os calos foram mantidos na ausência de luz por 30 dias, para o desenvolvimento dos calos embriogênicos.

#### *Regeneração do material vegetal*

Após os 40 dias, os calos embriogênicos que não oxidaram foram transferidos para frascos com capacidade de 200 mL com tampa de polipropileno, contendo 50 mL de meio de cultura MS, desprovidos de reguladores de crescimento vegetal. O material foi colocado em sala de crescimento, em luminosidade de  $57 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , medido com luxímetro FLUKE 5500A. O fotoperíodo foi de 16 h, e a temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### *Aclimatização do material regenerado*

As plântulas foram retiradas dos meios de cultura, separadas em câmara de fluxo vertical e colocadas em bandeja com água deionizada estéril para evitar a desidratação. As raízes foram lavadas para retirar o excedente de meio de cultura e colocadas em bandeja de alumínio, com 100 mL de água deionizada, sendo vedada com saco plástico transparente para manter a umidade das plântulas. Estas foram colocadas sob as mesmas condições de luminosidade, temperatura e fotoperíodo citados anteriormente, permanecendo por 15 dias.

Após esse período, as plântulas foram transferidas para tubetes de polipropileno preto, de 3,4 x 12,5 cm, contendo substrato comercial Plantmax HT<sup>®</sup>, sendo mantidas em casa de vegetação climatizada com nebulização duas vezes ao dia durante 15 min, temperatura variando entre 28 a 35°C e UR 60%. Aos 30 e 60 dias, as plântulas receberam suplementação da solução líquida do meio MS, contendo os macro e micronutrientes e as vitaminas, para auxiliar na sua nutrição e desenvolvimento. Aos

90 dias, as plântulas foram transferidas para sacos de polipropileno, medindo 16 x 22 cm, contendo o mesmo substrato citado anteriormente.

#### *Análise estatística*

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) e a homogeneidade dos dados foi analisada pelo teste de Bartlett. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Foi utilizando o programa computacional MSTAT-C versão 2.1 (RUSSEL, 1989).

### **Resultados e Discussão**

A formação de calos embriogênicos na cultivar RB966928 ocorreu nas concentrações de 3, 9, 16 e 27  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, proporcionando um percentual de massa calosa de 8, 24, 30 e 18% respectivamente. O clone RB986419 originou 26% de calos embriogênicos quando cultivados em meio MS suplementado com 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, sendo superior aos demais tratamentos (Tabela 1). Os calos de ambos genótipos tinham um aspecto compacto, amarelado e nodular e de fácil separação (Figura 1A e 1B), de forma semelhante às descritas na literatura (HO; VASIL, 1983; ARENCIBIA et al., 1995; LIMA et al., 2001; GARCIA et al., 2007).

A desdiferenciação dos explantes foi observada a partir do 5º dia para RB986419, e 7º dia para RB966928 após a implantação do experimento, sendo a formação de calos não embriogênicos observada visualmente, após 15 dias de cultivo *in vitro* para ambos. Os tratamentos de 3, 9, 16 e 27  $\mu\text{M}$  de 2,4-D do RB966928 e 1, 3, 9 e 27  $\mu\text{M}$  de 2,4-D do RB986419, não diferiram estatisticamente entre si na produção de calos não embriogênicos (Tabela 1). Entretanto, meio MS acrescido de 1 e 27  $\mu\text{M}$  para ambas cultivares, formaram uma elevada quantidade de calos com um aspecto mucilaginoso, que segundo a literatura não originam calos

embrionéticos (ARENCEBIA et al., 1995; LIMA et al., 2001; GARCIA et al., 2007) e plântulas (GARCIA et al., 2007), pois sua composição bioquímica é diferente (RODRÍGUEZ et al., 1995; NIEVES et al., 2003). Ho e Vasil (1983) relatam que o 2,4-D, utilizado em altas concentrações no meio de cultura, acarreta na formação desses calos

mucilaginosos e que, para o desenvolvimento de calos embrionéticos, o material deve permanecer por um tempo maior *in vitro*. Essa afirmação foi observada para os dois genótipos, mas somente em alguns explantes das concentrações de 9 e 16  $\mu\text{M}$  de 2,4-D.

**Tabela 1.** Efeito do 2,4-D na indução de calos embrionéticos, em explantes foliares de cana-de-açúcar, cultivar RB966928 e clone RB986419, após 40 dias de cultura.

Concentração de 2,4-D ( $\mu\text{M}$ )	Calos Embrionéticos	Calos Não Embrionéticos	Oxidados
<b>Cultivar RB966928</b>			
1	0	26 b	100 a
3	8 b	54 ab	88 a
9	24 ab	58 ab	90 a
16	30 a	76 a	84 a
27	18 ab	60 ab	78 a
<b>Clone RB986419</b>			
1	0	60 a	80 a
3	4 b	34 ab	94 a
9	26 a	48 ab	74 a
16	10 b	22 b	80 a
27	0	28 ab	96 a

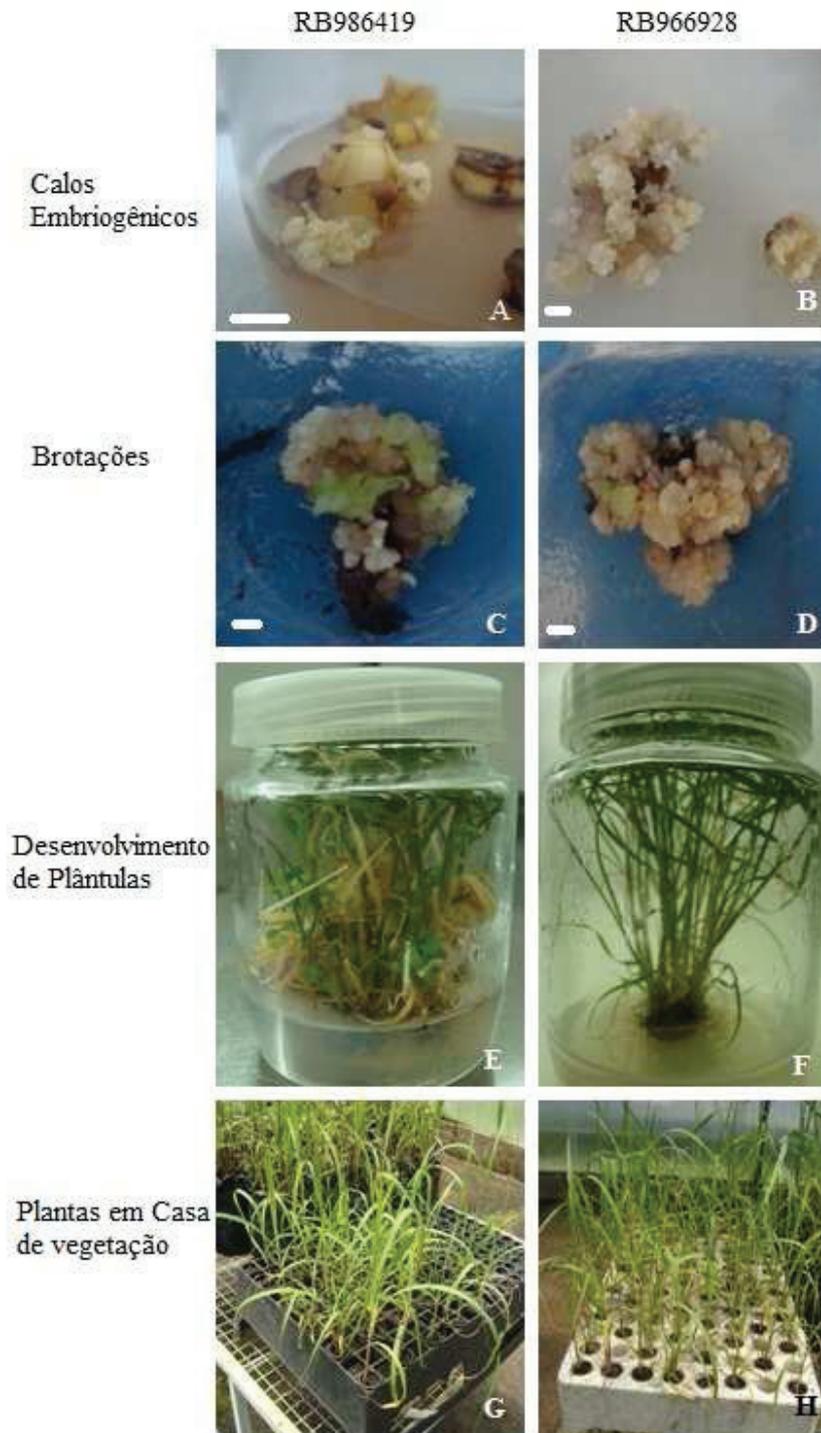
Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Mudry (2011).

Os explantes da cultivar e do clone apresentaram elevada porcentagem de oxidação, não demonstrando diferença significativa para essa variável entre as concentrações de 2,4-D (Tabela 1). Em alguns frascos, foi observada a necrose dos explantes. Porém, na maioria dos casos, essa oxidação ocorreu somente na folha externa do explante, com coloração variando do marrom claro ao escuro, permanecendo o centro deste com uma cor amarelada ou bege. A oxidação de explantes pode ser ocasionada pelos

componentes do meio de cultura como o ferro, cobre e zinco (UTINO; CARNEIRO; CHAVES, 2001). No meio MS as concentrações desses micronutrientes é elevada, se comparada com outros meios de cultura, como o WPM (NUNES et al., 2002). Este processo oxidativo pode ser explicado também pela liberação de compostos polifenólicos (GEORGE; SHERRINGTON, 1984) e fenólicos, limitando a obtenção de bons resultados *in vitro* (FLORES et al., 1998).

**Figura 1.** Indução de calos embriogênicos e regeneração de plantas de cana-de-açúcar, Clone RB986419 e Cultivar RB966928. Desenvolvimento inicial de calos embriogênicos (A e B); Detalhe do calo embriogênico com início das brotações (C e D); Desenvolvimento inicial de plântulas (E e F); Plantas em casa de vegetação (G e H). Barra: 5 mm.



Fonte: Mudry (2011).

Após 40 dias de cultivo *in vitro*, foram observadas brotações precoces de plântulas na cultivar RB966928 e desenvolvimento de raízes no clone RB986419 na concentração de 3  $\mu\text{M}$  de 2,4-D. Essas alterações morfológicas mostram que genótipos de cana-de-açúcar podem apresentar comportamento distinto com as mesmas concentrações de reguladores de crescimento.

As massas calosas e brotações, após transferidas para meio de regeneração (sem reguladores de crescimento), não desenvolveram plântulas, possivelmente por apresentarem maturação precoce. Resultados semelhantes foram observados por Jiménez (2005) em cereais, onde as massas embriogênicas levaram à brotações pouco

desenvolvidas e com dificuldades de se converter em plantas normais.

Para o segundo experimento, de modo geral, houve um aumento na formação de calos embriogênicos nas concentrações de 3, 9 e 16  $\mu\text{M}$  de 2,4-D em ambos genótipos, se comparado com o primeiro experimento. A maior porcentagem de calos embriogênicos obtida no clone RB986419 foi de 80%, utilizando-se 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos (Tabela 2). Essa indução de calos embriogênicos foi mais rápida, aproximadamente duas semanas antes do que a observada no primeiro experimento, para todos os tratamentos testados.

**Tabela 2.** Efeito do 2,4-D na indução de calos embriogênicos, em explantes foliares da cultivar RB966928 e do clone RB986419, de cana-de-açúcar, após 30 dias de cultivo *in vitro*.

Concentração de 2,4-D ( $\mu\text{M}$ )	Calos Embriogênicos	Calos Não Embriogênicos	Oxidados
<b>Cultivar RB966928</b>			
3	27 ab	54 b	94 a
9	33 ab	66 ab	96 a
16	41 a	80 a	84 a
<b>Clone RB986419</b>			
3	28 b	34 b	98 a
9	80 a	66 a	54 b
16	20 b	40 b	88 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Mudry (2011).

Vários estudos, com diferentes genótipos de cana-de-açúcar, mostram que as respostas do material vegetal *in vitro* são distintos (CIDADE et al., 2006), sendo esse um fator de grande influência na obtenção de material micropropagado. Porém, outros fatores que determinam as diferentes porcentagens de formação das massas calosas é a idade fisiológica do material a campo e a posição de retirada dos explantes da planta matriz (HO; VASIL, 1983), indicando que o resultado observado para os calos embriogênicos pode ter ocorrido pela diferença na época em que o material foi retirado do campo.

Embora não se tenha diferença significativa para oxidação na cultivar RB966928, pode-se observar que a redução na porcentagem de oxidação auxiliou na formação de calos embriogênicos e calos não embriogênicos para a concentração de 16  $\mu\text{M}$  de 2,4-D (Tabela 2). O mesmo ocorreu com o clone RB986419, que em 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D apresentou baixa oxidação e um elevação na formação desses calos. Da mesma forma que observado no primeiro experimento, a oxidação ocorreu principalmente na folha mais externa, permanecendo o centro do explante com a formação dos calos e coloração amarelada a bege.

Após a transferência dos explantes para a regeneração de plantas em meio de cultura sem regulador de crescimento vegetal, foi observada a formação de plântulas a partir dos 15 dias para RB966928 e RB986419 (Figura 1C e 1D). O desenvolvimento de plântulas e o enraizamento ocorreram a partir dos 46 dias de cultivo *in vitro* para os dois genótipos (Figura 1E e 1F). A formação de plântulas foi obtida em 28% dos calos embriogênicos da concentração de 16  $\mu\text{M}$  de 2,4-D para RB966928, e para o RB986419 houve 68% de desenvolvimento das brotações, provenientes de calos obtidos na concentração de 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D.

Apesar do número reduzido de plântulas formadas na cultivar RB966928, pode-se considerar pleno êxito para o processo de aclimatização, pois todas as plântulas sobreviveram (Figura 1G e 1H). O mesmo ocorreu para o clone RB986419. A manutenção da alta umidade relativa, desde a retirada dos explantes do meio de cultivo até a retomada de seu crescimento, é fator de extrema importância para a sua sobrevivência (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990).

## Conclusões

Para o clone RB986419, recomenda-se a utilização de 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D para a obtenção de calos embriogênicos;

Para a cultivar RB966928 é recomendado a utilização de 16  $\mu\text{M}$  de 2,4-D para a obtenção de calos embriogênicos.

## Referências

ARENCIBIA, A.; MOLINA, P.; DE LA RIVA, G.; SELMAN-HOUSSEIN, G. Production of transgenic sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by intact cell electroporation. *Plant Cellular Reports*, Berlin, v. 14, n. 5, p. 305-309, 1995.

BRISIBE, E. A.; MIYAKE, H.; TANIGUCHI, T.; MAEDA, E. Regulation of somatic embryogenesis in long-terms callus cultures of sugarcane (*Saccharum*

*officinarum* L.). *New Phytologist*, New York, v. 126, n. 2, p. 301-307, 1994.

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

CHENGALRAYAN, A. A.; GALLO-MEAGHER, A. In vitro regeneration of plants from sugarcane seed-derived callus. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, Dordrecht, v. 41, n. 4, p. 477-482, 2005.

CIDADE, D. A. P.; GARCIA, R. O.; DUARTE, A. C.; SACHETTO-MARTINS, G.; MANSUR, E. Morfogênese *in vitro* de variedades brasileiras de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 41, n. 3, p. 385-391, 2006.

CONAB. Cana-de-açúcar. 2011. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11\\_05\\_27\\_11\\_53\\_13\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_-\\_maio\\_2011\\_lo\\_lev.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_05_27_11_53_13_boletim_cana_portugues_-_maio_2011_lo_lev.pdf)>. Arquivo em: 27 jun. 2011.

DESAI, N. S.; SUPRASANNA, P.; BAPAT, V. A. Simple and reproducible protocol of direct somatic embryogenesis from cultured immature inflorescence segments of sugarcane (*Saccharum* spp.). *Current Science*, Bangalore, v. 87, n. 6, p. 764-768, 2004.

FALCO, M. C.; MENDES, B. M. J.; TULMANN NETO, A.; GLORIA, B. A. da. Histological characterization of *in vitro* regeneration of *Saccharum* sp. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Brasília, v. 9, n. 2, p. 93-97, 1996.

FLORES, R.; STEFANELLO, S.; FRANCO, E. T. H.; MANTOVANI, N. Regeneração *in vitro* de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.). *Revista Brasileira de Agrociência*, Pelotas, v. 4, n. 3, p. 201-205, 1998.

FRANKLIN, G.; ARVINTH, S.; SHEEBA, C. J.; KANCHANA, M.; SUBRAMONIAN, N. Auxin pretreatment promotes regeneration of sugarcane (*Saccharum* spp. Hybrids) midrib segment explants. *Plant Growth Regulation*, Dordrecht, v. 50, n. 2-3, p. 111-119, 2006.

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

GANDONOU, C. H.; 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. *African Journal of Biotechnology*, Kenya, v. 4, n. 11, p. 1250-1255, 2005.

- GARCIA, R.; CIDADE, D.; CASTELLAR, A.; LIPS, A.; MAGIOLI, C.; CALLADO, C.; MANSUR, E. *In vitro* morphogenesis patterns from shoot apices of sugarcane are determined by light and type on growth regulator. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 90, n. 2, p. 181-190, 2007.
- GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. *Plant propagation by tissue culture*. Inglaterra, Hants: Exegetics Limited, 1984. 709 P.
- GILL, R.; MALHTRA, P. K.; GOSAL, S. S. Direct plant regeneration from cultured young leaf segments of sugarcane. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 84, n. 2, p. 227-231, 2006.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: ABCTP, EMBRAPA-CNPq, 1990. p. 99-169.
- GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. *Apostila de biotecnologia*. Florianópolis: CCA/UFSC, 2006. 41 p. (Edição da Steinmacher).
- GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1999. p. 533-568.
- HO, J.; VASIL, I. K. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum*). The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny somatic embryos. *Protoplasma*, Dordrecht, v. 118, n. 3, p. 169-180, 1983.
- JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation*, Dordrecht, v. 47, n. 2-3, p. 91-110, 2005.
- JOYCE, P.; KUWAHATA, M.; TURNER, N.; LAKSHAMANAN, P. Selection system and co-cultivation medium are important determinants of *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarcane. *Plant Cellular Reports*, Berlin, v. 29, n. 2, p. 173-183, 2010.
- LAKSHMANAN, P. Invited review addendum: somatic embryogenesis in sugarcane – an addendum to the invited review ‘sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities’. *In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant*, Dordrecht, v. 41, n. 4, p. 345-363, 2006.
- LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R. J.; WANG, L.; ELLIOTT, A.; GROF, C. P. L.; BERDING, N.; SMITH, G. R. Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Shaccharum* spp. interspecific hybrids) leaf culture. *Plant Cellular Reports*, Berlin, v. 25, n. 4, p. 1007-1015, 2006.
- LIMA, M. A. C.; GARCIA, R. O.; MARTINS, G. S.; MANSUR, E. Morfogênese *in vitro* e suscetibilidade de calos de variedades nacionais de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) a agentes seletivos utilizados em sistemas de transformação genética. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 73-77, 2001.
- LOPES, M. A.; NASS, L. L.; MELO, I. S. Bioprospecção, a biotecnologia aplicada a prospecção e usos de serviços e funções da biodiversidade. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, v. 3, n. 4, p. 29-35, 2005.
- MARCANO, A. K.; PEDRO, M. G.; OROPEZA, M.; GARCIA, E. Optimización del proceso de embriogenesis somática en variedades venezolanas de caña de azúcar. *Acta Científica Venezolana*, Caracas, v. 53, n. 4, p. 251-257, 2002.
- MOLINARI, H. B. C. *Expressão estresse-induzida do gene P5CS em plantas transgênicas de cana-de-açúcar submetidas ao déficit hídrico*. 2006. Tese (Doutorado em Agronomia com Ênfase em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, Finlândia, v. 15, n. 3, p. 473-479, 1962.
- NIEVES, N.; SEGURA-NIETO, M.; BLANCO, M. A.; SÁNCHEZ, M.; GONZÁLEZ, A.; GONZÁLEZ, J. I.; CASTILLO, R. Biochemical characterization of embryogenic and non-embryogenic calluses of sugarcane. *In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant*, Dordrecht, v. 39, n. 3, p. 343-345, 2003.
- NUNES, E. C.; CASTILHO, C. V.; MORENO, F. N.; VIANA, A. M. *In vitro* culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 70, n. 3, p. 259-268, 2002.
- RIDESA – Programa de melhoramento genético de cana-de-açúcar. Liberação nacional de novas variedades “RB” de cana-de-açúcar – março 2010. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2010. 64 p.
- \_\_\_\_\_. Relatório técnico – ano 2008. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, p. 88, 2009.
- RODRÍGUEZ, S.; MONDÉJAR, C.; RAMOS, M. E.; DÍAZ, E.; MARIBONA, R.; ANCHETA, O. Sugarcane somatic embryogenesis: a scanning electron microscopy study. *Tissue & Cell*, Nova York, v. 28, n. 2, p. 149-154, 1995.
- RUSSEL, D. F. *MSTAT-C Statistical package. Program ver. 2.1*. Michigan State University, 1989.

SNYMAN, S. J.; MEYER, G. M.; RICHARDS, J. M.; HARICHARAN, N.; RAMGAREEB, S.; HUCKETT, B. I. Refining the application of direct embryogenesis in sugarcane: effect of the developmental phase of leaf disc explants and the timing of DNA transfer on transformation efficiency. *Plant Cellular Reports*, Berlin, v. 25, n. 10, p. 1016-1023, 2006.

TAYLOR, P. W. J.; DUKIC, S. Developmental of an *in vitro* culture technique for conservation of *Saccharum* spp. Hybrid germoplasm. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 34, n. 2, p. 217-222, 1993.

UTINO, S.; CARNEIRO, I. F.; CHAVES, L. J. Crescimento e oxidação de explantes de bananeira-prata (*Musa AAB*) *in vitro*. I. Concentrações de sais de ferro, cobre e zinco. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 225-229, 2001.

WATT, M. P.; BANASIAK, M.; REDDY, D.; ALBERTSE, E. H.; SNYMAN, S. J. In vitro minimal growth storage of *Saccharum* spp. hybrid (genotype 88H0019) at two stages of direct somatic embryogenic regeneration. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 96, n. 3, p. 263-271, 2009.