

EFEITO DA TEMPERATURA E LUMINOSIDADE NA REGENERAÇÃO IN VITRO DE PLANTAS DE TRIGO

TEMPERATURE AND LUMINOSITY EFFECT ON IN VITRO WHEAT PLANT REGENERATION

Dinara ORTOLAN¹
Adilson SCHUELTER²
Ivan SCHUSTER³
Eliane VENDRUSCOLO⁴

RESUMO

Nas condições de cultivo dos calos, a luminosidade e temperatura podem influenciar a resposta embriogênica e a regeneração de plantas. Estes dois fatores não têm sido examinados minuciosamente na literatura e o seu estudo poderia contribuir para o estabelecimento de protocolos mais eficientes. O genótipo CD104 foi avaliado sobre o estabelecimento de embriogênese somática. Foram usados como fonte de explante, embriões imaturos que foram cultivados em meio MS com dosagens decrescentes de 2,4-D formando três fases distintas: indução, manutenção e regeneração. Cada fase teve duração de 21 dias. Seis diferentes combinações entre temperaturas (4 °C e 25 °C) e luminosidade (fotoperíodo/escuro) foram aplicadas na fase de indução. Nos tratamentos que avaliaram o efeito da luminosidade, foram testadas duas condições: 1) Condição de fotoperíodo constante (16/8 horas luz/escuro) por 21 dias; 2) escuro (10 dias) e posteriormente transferência dos calos para fotoperíodo de 16/8 horas em câmara de cultivo (11 dias). Os dados demonstram que os melhores resultados obtidos para capacidade de indução, capacidade embriogênica e regeneração (100% e 95%; 58,5% e 54,7%; 37,8% e 30,7%, respectivamente) ocorreram com aplicação da condição 4 °C + luz e 4 °C + escuro, evidenciando que temperaturas baixas na indução podem favorecer a maior obtenção de plântulas. O tratamento com temperaturas de 25 °C e fotoperíodo apresentou os menores valores para a indução de calos (46%), capacidade embriogênica (23,9%) e regeneração (23,9%), mostrando que a presença de luminosidade e temperaturas de 25 °C podem desfavorecer a embriogênese.

Palavras-chave: trigo; embriogênese somática; luminosidade; temperatura; indução.

ABSTRACT

In vitro calli cultivation conditions, light and temperature can influence the embryogenic and plant regeneration response. These two factors have not been studied in details in the literature, and its determination could contribute to the settlement of a more efficient tissue culture protocol. Immature embryos of wheat genotype CD104 were used as source of explants. The embryos were cultivated in MS medium with decreasing concentrations of 2,4-D forming three different phases: induction, maintenance and regeneration for a period of 21 days each one. Six different treatments were applied and, these differed exclusively by the induction phase, with two temperature conditions (4 °C and 25 °C) and two light conditions (photoperiod/darkness). Two different conditions of light were evaluated: 1) Constant photoperiod of 16/8 hrs (21 days) and 2) Completely darkness (10 days) and later transference of calli to light/photoperiod (16/8 hrs) in cultivation chamber (11 days). The data showed that the best results obtained for induction capacity, embryogenic and regeneration capacities (100% and 95%; 58,5% and 54,7%; 37,8% and 30,7%, respectively) were in 4 °C light and 4 °C darkness conditions, revealing that low temperature applied at the induction phase had a positive effect on calli regeneration. The treatment conditions of 25°C and light got the lowest values for calli induction (46%), embryogenic capacity (23,9%) and regeneration (23,9%), what can be inferred as an unfavorable condition to embryogenic establishment.

Key-words: Wheat; somatic embryogenesis; luminosity; temperature; induction.

¹Bióloga, Universidade Paranaense, Av Parigot de Souza, 3636, CEP 85903-170, Toledo-Pr;

²Engenheiro Agrônomo, Doutor em Melhoramento Genético de Plantas, Professor da Universidade Paranaense, Av Parigot de Souza, 3636, CEP 85903-170, Toledo-Pr;

³Engenheiro Agrônomo, Doutor em Melhoramento Genético de Plantas, Pesquisador da Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola, BR 467, Km 98, Cx.Postal 301, CEP 85813-450, Cascavel-Pr;

⁴Engenheira Agrônoma, Doutora em Melhoramento Genético de Plantas, Professora adjunto da UFPR-Campus Palotina, Rua Pioneiro, 2153, Jd Dallas, Palotina-Pr CEP 85950-000 (*autor para correspondência- vendruscolo@ufpr.br).

INTRODUÇÃO

Paralelamente aos programas de melhoramento do trigo (*Triticum aestivum* L.), estudos que visam ampliar a variabilidade genética e servir de suporte para as biotecnologias mais modernas vêm sendo desenvolvidos e aplicados e, nestes, inclui-se a cultura de tecidos e regeneração de plantas (REPELLIN *et al.*, 2001).

Para o estabelecimento de um sistema de regeneração de plantas em cereais diversos fatores já foram descritos na literatura: reguladores de crescimento (MAES *et al.*, 1996; PRZETAKIEWICZ *et al.*, 2003; SATYAVATHI *et al.*, 2004); efeito do genótipo (BHASKARAN e SMITH, 1990; HESS e CARMAN, 1998); tipo de explante: (VIERTEL e HESS, 1996; REDWAY *et al.*, 1990; MACCHI *et al.*, 1998); os meios de cultura (HARVEY *et al.*, 1999; GONZALEZ *et al.*, 2001) e condições de cultivo (GRANDO *et al.*, 1993; TAMÁS *et al.*, 2004).

Nas condições de cultivo dos calos, a luminosidade e temperatura podem influenciar a resposta embriogênica e a regeneração de plantas (THORPE, 1994; TAMÁS *et al.*, 2004). Embora a temperatura tenha um maior efeito no crescimento e desenvolvimento em ambos os tipos de crescimentos: *in vivo* e *in vitro*, este fator não tem sido examinado minuciosamente, pois a maioria dos trabalhos descreve protocolos de regeneração com temperaturas constantes de 20 a 30 °C (TAMÁS *et al.*, 2004). A luz, outro fator determinante no desenvolvimento vegetal, aparece descrita de modo generalizado em relação às necessidades ótimas de cada espécie para crescimento e diferenciação (CAMPBELL *et al.*, 1998; TAMÁS *et al.*, 2004). Porém, diferentes espécies podem apresentar temperaturas e condições de luminosidade ótimas peculiares, principalmente na fase de indução, crescimento e regeneração de plantas (CHALUPA, 1987).

Uma maneira arbitrária de determinar a necessidade de luz para a espécie é a observar a natureza da cobertura *in situ* que envolvem o embrião e adotar a incubação no escuro se a espessura dos tecidos envolventes for suficiente para barrar a maior parte da penetração da luz incidente e usar a incubação na luz, caso os tecidos envolventes sejam translúcidos (HU e FERREIRA, 1998a). Esta não é a melhor estratégia, pois não exclui a possibilidade de que a condição contrária possa resultar em melhor crescimento e regeneração de plantas. Usualmente, nas câmaras de cultivo a intensidade luminosa é de 3 a 5 W m⁻², em algumas espécies como a *Ilex*, intensidade baixas (2 W m⁻²) pode inibir a embriogênese (HU e FERREIRA, 1998b). Para esta espécie, o cultivo de cinco a sete dias iniciais no escuro, com subsequente transferência para a luz, mostrou ser eficiente para a obtenção de mudas semelhantes às obtidas *in situ* (FERREIRA *et al.*, 1995).

A maioria dos pesquisadores arbitrariamente escolhe a temperatura de incubação de 25 °C, não importando o tipo de planta. Esta temperatura parece

possibilitar a embriogênese e a germinação, embora não seja necessariamente ótima para o desenvolvimento da espécie (HU e FERREIRA, 1998a).

Na cultura do trigo, a grande maioria dos protocolos de embriogênese e regeneração, a partir de embriões imaturos, preconiza o cultivo dos embriões no escuro de seis a dez dias, com subsequente passagem para período de fotoperíodo (16 horas luz/8 horas escuro) em temperaturas constantes de 25 °C (MILACH *et al.*, 1991; PELLEGRINESCHI *et al.*, 2004; TAMÁS *et al.*, 2004).

O presente trabalho tem como objetivo testar diferentes combinações de temperatura e luminosidade na fase de indução de calos e avaliar os seus efeitos na regeneração de plântulas de trigo.

METODOLOGIA

O genótipo CD104 é proveniente do programa de melhoramento da Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola Ltda (Coodetec). As plantas doadoras de trigo foram crescidas em casa de vegetação, com temperaturas diurnas e noturnas em torno de 25 ± 2 °C e 18 ± 2 °C, respectivamente. Os explantes iniciais utilizados para os experimentos de regeneração foram embriões imaturos de sementes coletadas em estágio leitoso com aproximadamente 14 - 16 dias após a antese. As sementes foram desinfetadas em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% por 20 a 30 min, seguidas por três lavagens em água autoclavada. Após, as sementes foram imersas em etanol a 70% (v/v) por 1 min e postas para secar em papel filtro. Os embriões imaturos tiveram seus coleóptilos excisados e foram dispostos em meio de indução na placa.

Foi utilizado o meio de indução MS (MUSHARIGE e SKOOG, 1962) com concentração de 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), o meio de manutenção com concentração de 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, e para regeneração meio sem 2,4-D, solidificado com 3,0 g L⁻¹ de Phytigel™. O meio foi ajustado para pH 5,8 antes da esterilização.

Para avaliar o comportamento dos embriões imaturos frente a diferentes condições de cultivo, seis diferentes combinações de temperatura e luminosidade foram aplicadas (Tabela 1).

Os seis tratamentos estabelecidos diferiram exclusivamente pela fase de indução, sendo aplicados duas condições de temperatura (4 °C e 25 °C) e duas condições de luminosidade (fotoperíodo/escuro). Nos tratamentos que avaliaram o efeito da luminosidade, foram testadas duas condições: 1) Condição de fotoperíodo constante (16/8 horas luz/escuro) por 21 dias (Tratamentos 1, 2 e 3) e 2) escuro (dez dias) e posteriormente transferência dos calos para fotoperíodo de 16/8 horas em câmara de cultivo (11 dias) (Tratamentos 4, 5 e 6). A condição de fotoperíodo (16/8 horas luz/escuro) foi provida por lâmpadas fluorescentes com cerca de 3 W m⁻² (PAR) em câmara de cultivo. Para propiciar a condição "escuro", as placas contendo os embriões foram envolvidos ou

cobertos com papel alumínio para evitar a passagem de luz por dez dias. Para a avaliação do efeito da temperatura sobre o cultivo *in vitro* dos embriões imaturos, uma BOD (estufa de crescimento

controlado, Tecnal-Brasil) foi usada. Esta foi regulada para atingir e manter 4 °C constantes, checados periodicamente com termômetro de mercúrio (dados não mostrados). A outra temperatura aplicada foi 25 °C obtida em câmara de cultivo (Tabela 1).

TABELA 1– Diferentes combinações de temperatura e luminosidade aplicadas aos embriões imaturos de trigo (cv CD104) na fase de indução de cultivo.

Tratamentos	Temperaturas (dias)		Condição de Luminosidade (dias)	
	4 °C	25 °C	Escuro	Luz
1	21	-	-	21
2	-	21	-	21
3	10	11	-	21
4	21	-	10	11
5	-	21	10	11
6	10	11	10	11

O genótipo CD 104 foi escolhido pelo fato de apresentar em experimentos preliminares os maiores valores percentuais para capacidade embriogênica (37,5%) e regeneração de plântulas (1,3 plantas/calos embriogênico), obtidas em condições de 10 dias escuro e 21 dias claro com temperaturas constantes de 25°C (VENDRUSCOLO, 2005).

Dez embriões foram cultivados por placa Petri (8,5 cm de diâmetro), sendo utilizadas 10 placas para cada tratamento. As demais etapas do cultivo dos embriões (manutenção e regeneração) ocorreram em câmara de cultivo, onde a temperatura permaneceu constante em torno de 25 °C com fotoperíodo de 16/8 horas (aproximadamente 3 W m⁻²). Todas as fases tiveram duração de 21 dias. Na 1ª Fase - indução foram avaliados a quantidade de embriões que formaram calos, em cada uma das condições de cultivo. Na 2ª Fase – manutenção avaliaram-se os calos que apresentaram pontuações verdes ou regiões embriogênicas. Na avaliação final – regeneração (63 dias), a quantidade de plântulas foi observada.

Os dados foram avaliados por meio da estatística descritiva onde a porcentagem de indução de calos foi obtida pela razão entre o número de calos induzidos, a partir de embriões imaturos para cada genótipo, obtidos após 21 dias do resgate em meio de indução. A capacidade de regeneração para cada genótipo foi determinada pela razão do número de calos embriogênicos que apresentaram estruturas embriogênicas ou pontos verdes (embrióides) pelo número de calos induzidos. As porcentagens de plântulas obtidas foram obtidas pela razão entre o número de plântulas regeneradas e o número de calos induzidos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os explantes usados foram embriões imaturos e a iniciação da formação de calos foi observada a partir de dez dias após os embriões terem sido dispostos no meio de cultura. Os calos embriogênicos foram observados nos meios de manutenção a partir do 21º dia de cultivo. As plântulas foram obtidas a partir da transferência de calos embriogênicos sem

fragmentação para o meio de regeneração, avaliadas após 63 dias de cultivo.

Os dados obtidos indicam que a aplicação de temperatura de 4 °C na fase de indução proporcionou os melhores resultados, independentemente da condição luminosa aplicada. Os tratamentos 4 °C luz e 4 °C escuro foram os que originaram a maior porcentagem de calos (100 e 95, respectivamente) e de plântulas (31 e 23, respectivamente). O tratamento 6, com os embriões sendo dispostos no escuro, a 4 °C e depois transferidos a 25 °C foi o que proporcionou a menor porcentagem de calos induzidos e a menor porcentagem de plântulas regeneradas (43 e 11, respectivamente). Os resultados demonstram um efeito positivo das temperaturas baixas (4 °C) sobre a indução de calos e regeneração de plântulas neste cereal.

Os dados obtidos indicam diferenças na indução de calos e na capacidade embriogênica e de regeneração entre os tratamentos (Tabela 2). As porcentagens de indução de calos nos tratamentos avaliados variaram de 43 a 100%; para a capacidade de embriogênica, valores de 23,9 a 58,5% e para a regeneração valores entre 23,9 e 37,8% demonstrando diferenças entre os seis tratamentos quanto a habilidade de cultivo *in vitro*.

Os tratamentos com 4 °C luz e 4 °C escuro (tratamentos 1 e 4, respectivamente) foram os que apresentaram os maiores valores para indução de calos (100% e 95%) e os maiores valores para capacidade de formações de calos embriogênicos (58,5% e 54,7%, respectivamente) (Tabela 2).

A influência da temperatura no desenvolvimento embriogênico foi verificada nos tratamentos 1, 2, 4 e 5 (Tabela 2). Nestes tratamentos, as temperaturas avaliadas foram constantes (4 °C e 25 °C) com variação na luminosidade. Os dados demonstram que em condições de mesma temperatura (4 °C luz e 4 °C escuro), os valores para capacidade de indução (100% e 95%), capacidade embriogênica (58,5% e 54,7%) e capacidade regenerativa (37,8% e 30,7%) foram superiores, evidenciando que as temperaturas baixas nos primeiros dias de indução podem favorecer a maior obtenção de plântulas no trigo.

TABELA 2— Porcentagens de indução de calos, capacidade embriogênica e regeneração de plântulas obtidos em diferentes condições de cultivo do genótipo CD104.

Tratamentos	% indução de calos	% pontos verdes	% plântulas obtidas
4 °C luz	100	58,5	37,8
25 °C luz	46	23,9	23,9
4 → 25 °C luz	59	26,3	32,2
4 °C escuro	95	54,7	30,7
25 °C escuro	61	38,3	28,3
4 25 °C escuro	43	25	25,6

As possíveis explicações, para o efeito positivo das baixas temperaturas na embriogênese e regeneração do trigo, seriam o fato de que estas temperaturas modificariam metabolicamente os calos, aumentando o conteúdo de proteínas solúveis, possibilitando o maior desenvolvimento embriogênico (CLOUTIER, 1983; KARIMZADEH *et al.*, 2000).

O tratamento 2 com temperaturas de 25 °C e fotoperíodo aplicado constantemente durante a fase de indução, apresentou os menores valores para a indução de calos (46%), capacidade embriogênica (23,9%) e regeneração (23,9%), mostrando que a presença de luz na fase indutiva da regeneração, combinada com temperaturas mais elevadas (25 °C) podem desfavorecer a embriogênese (Tabela 2).

Nos tratamentos com alteração de temperatura e luminosidade (Tratamentos 3 e 6), os resultados são diferentes, porém, não muito contrastantes: para a capacidade de indução foram obtidos valores de (59% e 43%), para capacidade embriogênica (26,3 e 25%) e para capacidade regenerativa (32,2 e 25,6%) (Tabela 2).

Neste experimento, os melhores resultados foram obtidos sob condições de 4 °C e luz na fase de indução. Uma possível explicação, para a influência da presença de intensidade luminosa na embriogênese somática, seria que, a concentração de luminosidade poderia produzir o maior acúmulo de fotossintetizados, gerando calos maiores e

maior número de embriões ou pontos verdes (CAMPBELL *et al.*, 1998).

Por outro lado, os altos valores obtidos também, para o tratamento com 4 °C e escuro, concordam com HE *et al.* (1986) no trigo. Os autores observaram, que a presença de luz durante a fase de indução reduziu a indução de calos (59%) enquanto que os embriões submetidos ao escuro originaram mais calos (76%). Porém, a condição de escuro atrasou a regeneração de plantas. Após três meses de cultivo *in vitro*, 80% dos calos submetidos à luz geraram plântulas enquanto que dos calos submetidos ao escuro, somente 17% geraram plântulas.

CONCLUSÕES

No estabelecimento de protocolo de embriogênese e regeneração a partir de embriões imaturos no genótipo CD104, condições de temperaturas baixas (4 °C) independente da condição de luminosidade, apresentaram ter um efeito positivo, melhorando a eficiência de regeneração de plantas. Por outro lado, a presença de luminosidade e temperaturas de 25 °C, aplicados na fase de indução, podem desfavorecer a embriogênese.

AGRADECIMENTO

À Coodetec pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. BHASKARAN, S.; SMITH, H. Regeneration in cereal tissue culture: A review. **Crop Science**, n. 30, p.1328-1336, 1990.
2. CAMPBELL, A.W.; GRIFFIN, W.B.; CONNER, A.J.; ROWARTH, J.S.; BURRITT, D.J. The effects of temperature and light intensity on embryo numbers in wheat doubled haploid production through wheat x maize crosses. **Annals of Botany**, n. 82, p. 29-33, 1998.
3. CHALUPA, V. Temperature. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (Eds.) **Cell and Tissue Culture in Forestry**, v. 1, p. 142-151, 1987.
4. CLOUTIER, Y. Changes in the electrophoretic pattern of the soluble proteins of winter wheat and rye following cold acclimation and desiccation stress. **Plant Physiology**, v. 71, p. 400-403, 1983.
5. FERREIRA, A.G.; ALMEIDA-CORTEZ, J.S.; CUNHA, G.G. Fisiologia de *Ilex paraguariensis* com ênfase na embriologia experimental. In: WINGE, H.; FERREIRA, A.G.; MARIATH, J.E.A.; TARASCONI, L.C. (Eds.). **Erva-Mate: biologia e cultura no Cone Sul**. Porto Alegre: UFRGS, 1995. p. 161-172.
6. GONZALEZ, J.M.; FRIERO, E.; JOUVE, N. Influence of genotype and culture medium on callus formation and plant regeneration from immature embryos of *Triticum turgidum* desf. cultivars. **Plant Breeding**, n. 120, p. 513-517, 2001.
7. GRANDO, M.F.; EICHLER, L.; TANABE, C.R.; SANTOS, J.F.; SANTOS, C.M. Indução de calos e regeneração de plantas em três tipos de aveia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 5, n. 2, p. 139-144, 1993.
8. HARVEY, A.; MOISAN, L.; LINDUP, S.; LONDALE, D. Wheat regenerated from scutellum callus as a source of material for transformation. **Plant Cell, Tissue Organ and Organ Culture**, n. 57, p. 153-156, 1999.
9. HE, D.G.; TANNER, G.; SCOTT, K.J. Somatic embryogenesis and morphogenesis in callus derived from the epiblast of immature embryos of wheat (*Triticum aestivum*). **Plant Science**, n. 45, p. 119-124, 1986.

10. HESS, J.R.; CARMAN, J.G. Embryogenic competence of immature wheat embryos: genotype, donor plant environment, and endogenous hormone levels. **Crop Science**, n. 38, p. 249-253, 1998.
11. HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Light mediated inhibition of *in vitro* late embryogeny of *Ilex*. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998 a. v. 1. p. 371-382.
12. HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. *In vitro* embryology of *Ilex*. In: PARÉ, J.; BUGNICOURT, M. **Some aspects and actual orientations in plant embryology**. Amiens: University of Picardie, p.76-90, 1998 b.
13. KARIMZADEH, G.; FRANCIS, D.; DAVIES, M.S. Low temperature induced accumulation of protein is sustained both in root meristems and in callus in winter wheat but not in spring wheat. **Annals of Botany**, n. 85, p. 769-777, 2000.
14. MACCHI H., MIZUNO H., HIRABAYASHI T., LI H., HAGIO T. Screening wheat genotypes for high callus induction and regeneration capability from anther and immature embryo cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 53, p. 67-74, 1998.
15. MAES, O.C.; CHIBBAR, R.N.; CASWELL, K.; LEUNG, N.; KARTHA, K.K. Somatic embryogenesis from isolated scutella of wheat: effects of physical, physiological and genetic factors. **Plant Science**, n. 121, p. 75-84, 1996.
16. MILACH, S.; FEDERIZZI, L.C.; CARVALHO, F.I.F. Regeneração de plantas no cultivo de calos de genótipos brasileiros de trigo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, p. 1947-1956, 1991.
17. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
18. PELLEGRINESCHI A., BRITO R.M., MCLEAN S., HOISINGTON D. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and NaCl on the establishment of callus and plant regeneration in durum and bread wheat. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 77, p. 245-250, 2004.
19. PRZETAKIEWICZ, A.; ORCZYK, W.; NADOLSKA-ORCZYK, A. The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticale. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 73, n. 3, p. 245-125, 2003.
20. REDWAY, F.A.; VASIL, V.; LU, D.; VASIL, I.K. Identification of callus types for long term maintenance and regeneration from commercial cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, n. 79, p. 609-617, 1990.
21. REPELLIN, A.; BAGA, M.; JAUHAR, P.P.; CHIBBAR, R.N. Genetic enrichment of cereal crops via alien gene transfer: new challenges. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 64, p. 159-183, 2001.
22. SATYAVATHI, V.V.; JAUHAR, P.P.; ELIAS, E.M.; RAO, M.B. Effects of growth regulators on *in vitro* plant regeneration in Durum wheat. **Crop Science**, n. 44, p. 1839-1846, 2004.
23. TAMÁS, C.; SZUCS, P.; RAKSZEGI, M.; TAMÁS, L.; BEDO, Z. Effect of combined changes in culture medium and incubation conditions on the regeneration from immature embryos of elite varieties of winter wheat. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 79, n. 1, p. 39-44, 2004.
24. THORPE, T.A. Morphogenesis and regeneration. In: VASIL, I.K.; THORPE, T.A. (Eds). **Plant Cell and Tissue Culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. p. 17-36.
25. VENDRUSCOLO, E.C.G. **Transformação de trigo (*Triticum aestivum* L.) com o gene p5cs e avaliação de plantas transgênicas para tolerância ao estresse hídrico e baixas temperaturas**. Maringá, 2005. 158 f. Tese (Doutorado em Melhoramento Genético Vegetal) - Curso de Pós Graduação em Agronomia, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá.
26. VIERTTEL, K.; HESS, D. Shoot tips of wheat as an alternative source for regenerable embryogenic callus cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 44, p. 183-188, 1996.

Recebido em 21/12/2006

Aceito em 03/04/2007