

**Indução de Embriões Somáticos
na Cultivar de Amendoim
BRS Pérola Branca**





ISSN 0103-0841

Maio, 2015

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Algodão
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 97

Indução de Embriões Somáticos na Cultivar de Amendoim BRS Pérola Branca

Julita Maria Frota Chagas Carvalho
Fernanda Kalina da Silva Monteiro
José Wellington dos Santos

Campina Grande, PB
2015

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Algodão

Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário
CEP 58428-095
Caixa Postal 174
Fone: (83) 3182 4300
Fax: (83) 3182 4367
Home page: <http://www.cnpa.embrapa.br>
E-mail: cnpa.sac@embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Valdinei Sofiatti
Secretário-Executivo: Geraldo Fernandes de Sousa Filho
Membros: Dartanhã José Soares, Everaldo Paulo de Medeiros, Francisco José Correia Farias, João Henrique Zonta, José Ednilson Miranda, Máira Milani, Nair Helena Castro Arriel e Thaise Dantas de Almeida Xavier
Supervisão editorial: Geraldo Fernandes de Sousa Filho
Revisão de texto: Everaldo Correia da Silva Filho
Normalização bibliográfica: Maria Gorette dos Santos Silveira
Edição eletrônica: Geraldo Fernandes de Sousa Filho
Foto da capa: Julita Maria Frota Chagas Carvalho

1ª edição

1ª impressão (2015): on-line.

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Algodão

Indução de Embriões Somáticos na Cultivar de Amendoim BRS Pérola Branca / Julita Maria Frota Chagas Carvalho ... [et. al]. – Campina Grande : Embrapa Algodão, 2015.

21 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Algodão, ISSN 0103-0841 ; 97)

1. Indução de embriões somático. 2. Cultivares. 3. Amendoim BRS pérola braca. I. Carvalho, Julita Maria Frota ChagaS. II. Monteiro, Fernanda Kalina da Silva. III. Santos, José Wellington dos. IV. Ferreira, Alexandre Cunha de Barcellos. V. Título. VI. Série.

CDD 633.368

Sumário

| | |
|-----------------------------|----|
| Resumo..... | 5 |
| Abstract..... | 7 |
| Introdução..... | 9 |
| Material e Métodos..... | 10 |
| Resultados e Discussão..... | 12 |
| Conclusão..... | 16 |
| Referências | 16 |

Indução de Embriões Somáticos a Cultivar de Amendoim BRS Pérola Branca

Julita Maria Frota Chagas Carvalho¹

Fernanda Kalina da Silva Monteiro²

José Wellington dos Santos³

Resumo

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.), pertencente à família Fabaceae, é uma espécie anual conhecida por possuir em sua composição química proteínas de alto valor nutricional, ser uma oleaginosa comestível, relacionada diretamente com a alimentação humana e também por poder ser utilizada por indústrias de conservantes, oleoquímicas e na produção de biodiesel. A multiplicação *in vitro* de plantas, por meio da embriogênese somática, é um processo vantajoso no que diz respeito ao armazenamento de propágulos por criopreservação. O presente estudo objetivou induzir a embriogênese somática direta em embriões zigóticos da cultivar BRS Pérola Branca e analisar o efeito dos reguladores de crescimento na indução dos mesmos, para definir o melhor tratamento para regeneração. Foram considerados como fonte de explantes eixos embrionários, os quais foram excisados das sementes e desinfestados em uma solução de hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo, adicionando-se uma gota de tween-20 para cada 100 mL de solução. Os explantes foram inoculados em placa de Petri contendo saís de MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com vitamina do meio B5 (Gamborg et al., 1968) e duas concentrações (15 mg.L⁻¹ e 35 mg.L⁻¹) de cada um dos reguladores de crescimento 2,4D diclorofenoxiacético (2,4D), ácido naftaleno acético (ANA) e 2-isopentenil (2iP), de acordo com os tratamentos estipulados. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 2 + 1, sendo três reguladores de crescimento (2,4-D, ANA e 2iP), duas concentrações (15 mg.L⁻¹ e 35 mg.L⁻¹) + 1 testemunha, com dez repetições e dez explantes por placa de Petri. A partir da análise de variância realizada, verificaram-se diferenças significativas a 5% de probabilidade pelo Teste F, onde o tratamento com ANA mostrou-se mais eficiente na indução de embriões somáticos, com média de 2,93. Contudo, o regulador de crescimento 2iP não se mostrou eficaz na indução, pelo fato de inibir o crescimento de células competentes para a embriogênese somática.

Termos para indexação: *Arachis hypogaea* L., cultura de tecidos, ácido naftaleno acético, embriogênese somática.

¹Engenheira-Agrônoma, Ph.D. em Microbiologia, Pesquisadora da Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário, CEP 58428-095, Campina Grande, PB, julita.carvalho@embrapa.br.

²Bolsista CNPq/Embrapa., fernanda.silva.bio@gmail.com

³Engenheiro-Agrônomo, M.Sc em Agronomia (Estatística e Experimentação Agronômica), Pesquisador da Embrapa Algodão, jose-wellington.santos@embrapa.br

Induction of Somatic Embros in Peanut Cultivar BRS Pérola Branca

Abstract

The peanut (*Arachis hypogaea* L.) belonging to the Fabaceae family, is an annual species known to possess in its chemical composition proteins of high nutritional value, being an edible oilseed, directly related to the food and also because it can be used by industries preservatives, and the production of biodiesel. The *in vitro* multiplication of plants through somatic embryogenesis process is advantageous with respect to storage of propagules for cryopreservation. Thus, this study aimed to induce somatic embryos in peanut crops from the *in vitro* performed with BRS Pérola Branca, and observe the effect of growth regulators on the induction of the same. In the first instance, the study aimed to analyze which only growth regulators would be more suitable for the induction of somatic embryogenesis, either for propagating purposes on a large scale, as for future genetic studies. Were added to the medium, according to established treatments, the following growth regulators and their respective concentrations: 15 mg.L⁻¹ and / or 35 mg.L⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 15 mg.L⁻¹ and / or 35 mg.L⁻¹ naphthalene Acetic Acid (NAA) and 15 mg.L⁻¹ and / or 35 mg.L⁻¹ Isopentyl Adenine (2iP), plus control without regulator. The design was completely randomized factorial 3x2 + 1, three growth regulators (2,4-D, NAA and 2iP), two concentrations (15:35 mg.L⁻¹) + 1 check, with ten replicates and ten explants per dish. From the analysis of variance applied, it can be seen that there was significant at the 5% probability by F test, in which the ANA was more efficient in inducing somatic embryos differences. However, the regulator 2iP was not effective in inducing, because inhibiting the growth of competent cells to somatic embryogenesis.

Index terms: *Arachis hypogaea* L., tissue culture, naphthalene acetic acid, somatic embryogenesis.

Introdução

As técnicas de cultivo *in vitro* possibilitam a conservação de grande número de propágulos em pequeno espaço físico, a obtenção de clones para manutenção em outros bancos de germoplasma, a segurança em virtude do baixo risco de ataque de pragas e a integração dessas técnicas com a demais como forma de conservação (ENGLEMANN, 1977).

Dentre as aplicações da cultura de tecidos vegetais, a micropropagação é a técnica de maior impacto e de resultados mais concretos (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Engloba diferentes etapas que vão desde o estabelecimento da cultura *in vitro* até seu enraizamento, culminando com a aclimatização da microplanta (BASTOS et al., 2007).

Um dos fatores que pode ter maior influência na propagação *in vitro* é o uso de reguladores de crescimento. Na micropropagação, sua influência já foi constatada em vários trabalhos, sendo essas substâncias, em muitos casos, indispensáveis ao bom desenvolvimento da cultura *in vitro*, tanto no estabelecimento quanto em fases posteriores (GEORGE, 1996).

A indução da embriogênese somática é o desencadeamento de um processo morfogênético pela exposição do explante a um estímulo físico, químico ou biológico, sendo a etapa mais crítica para o estabelecimento das culturas embriogênicas *in vitro* (GUERRA e NODARE, 2006). Segundo Elhiti Stasolla, (2011) a embriogênese somática é o processo pelo qual células somáticas ou não gaméticas mudam sua rota de desenvolvimento e entram em uma via embriogênica, culminando na formação de embriões somáticos, sendo um exemplo da totipotência das células vegetais, em que uma única célula é capaz de regenerar uma planta inteira, (MOURA, 2007). Entretanto, o potencial embriogênico não é somente determinado geneticamente, mas também é influenciado pelo meio de cultura e pela qualidade do explante (LOYOLA e VARGAS et al, 1999).

Guerra et al. (1999) e Hogberg et al. (1998) mencionam que a partir das técnicas de embriogênese somática é possível obter uma grande quantidade de propágulos de forma sincronizada. Além disso, há possibilidade de um alto grau de automatização do sistema, permitindo baixar o custo efetivo da produção em larga escala de plântulas por embriogênese somática.

Contudo, Jimenez (2005) alerta que, para que esta técnica obtenha resultados satisfatórios, sejam necessários protocolos de indução e regeneração bem estabelecidos a fim de que seja possível controlar o grande número de variáveis, determinadas por fatores genéticos, pelo estado fisiológico do explante e pelo efeito do meio sobre fatores endógenos.

A semente de amendoim tem teores variados de óleos nas sementes, variando entre 43% até 52% (SANTOS, 2013). Dependendo da forma de armazenamento, o poder germinativo pode ser abreviado, inviabilizando o vigor e a emergência das plantas. Uma alternativa de recuperação é por meio de técnicas *in vitro*, que possibilita a clonagem de plantas sadias e geneticamente superiores em escala comercial, além de colaborar na realização de estudos de transformação genética e conservação de espécies vegetais (ALVES et al., 2008). Dentre as técnicas adotadas para amendoim, a multiplicação via embriogênese somática tem a vantagem de possibilitar o armazenamento dos propágulos por um longo prazo por meio da criopreservação.

Para o sucesso da técnica, contudo, há necessidade de protocolos bem estabelecidos que permitam a recuperação da planta na íntegra (JIMÉNEZ, 2005; PAIS, 2003; Carvalho e Vital (2003). A obtenção de protocolo para multiplicação do amendoim via embriogênese somática irá viabilizar os processos de transformação e recuperação dos acessos do Banco de Germoplasma (BAG). De acordo com Carvalho et al (2006), a embriogênese somática na maioria das espécies é genótipo-dependente, o que torna necessário testar protocolos de indução da embriogênese somática em genótipos diferentes.

Diante disso, o presente estudo objetivou induzir a embriogênese somática direta em embriões zigóticos da cultivar de amendoim BRS Pérola Branca e analisar o efeito dos reguladores de crescimento na indução dos embriões, para definir o melhor tratamento para regeneração.

Material e Métodos

Os trabalhos foram realizados no Laboratório de Cultivo de Tecidos Vegetais da Embrapa Algodão, Campina Grande, PB. Utilizaram-se sementes da cultivar de amendoim BRS Pérola Branca, provenientes

de Barbalha, CE, colhidas em 2012. Essa cultivar foi selecionada por apresentar elevado teor de óleo nas sementes, na faixa de 50% (SANTOS et al, 2013), e ter viabilidade germinativa reduzida em ambientes de elevada insolação.

Foram considerados como fonte de explantes eixos embrionários, os quais foram excisados das sementes e desinfestados em uma solução de hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo, adicionada com uma gota de tween-20 para cada 100 mL de solução.

Na câmara de fluxo laminar os explantes foram inoculados em placa de Petri contendo sais de MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com vitamina do meio B5 (GAMBORG et al., 1968), e duas concentrações (15 mg.L⁻¹ e 35 mg.L⁻¹) de cada um dos reguladores de crescimento 2,4D diclorofenoxiacético (2,4D), ácido naftaleno acético (ANA) e 2-isopentenil (2iP), de acordo com os tratamentos estipulados. Foi adicionado ao meio 3% de sacarose, 0,25% de gelrite, e o pH foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem. Após a indução, os cultivos foram transferidos para a sala de crescimento e mantidos no escuro a uma temperatura de 25 °C ± 2 °C com foto período de 16h de luz e intensidade luminosa de 30 μmol m⁻²s⁻¹.

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 2 + 1 (três reguladores de crescimento, duas concentrações dos reguladores mais uma testemunha), com dez repetições. A unidade experimental foi composta de uma placa de Petri contendo dez explantes.

Aos 30 dias de cultivo, a avaliação dos explantes foi feita mensurando-se a presença ou não de embriões somáticos e, após, subcultivados em meio de rediferenciação, em que permaneceram por mais 30 dias ainda no escuro. Os embriões somáticos foram identificados com auxílio de uma lente de aumento 20 x 30 MM.

Os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o programa SAS 9.2. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados e discussão

Na Tabela 1 encontra-se a análise de variância simplificada para a variável número de embriões somáticos, verificando-se que houve diferença estatística significativa a 5% de probabilidade pelo Teste F para Regulador (Rc), para interação Rc x Cr (concentração de reguladores de crescimento), entretanto, para (Cr), não houve efeito significativo, o que indica que as duas concentrações respondem indistintamente à indução de ES (embriões somáticos).

Tabela 1. Análise de variância do número de embriões somáticos em amendoim induzidos após 30 dias de cultivo em função de diferentes concentrações de reguladores de crescimento. Campina Grande, PB, 2014.

| F.V | G.L | SQ | QM | F |
|------------------|-----|---------|-------|---------|
| Regulador (Rc) | 2 | 15,0329 | 7,514 | 7,76 ** |
| Concentração(Cr) | 1 | 1,3326 | 1,326 | 1,37 NS |
| Rc x Cr | 2 | 11,704 | 5,852 | 6,04 ** |
| Fatorial vs. tes | 1 | 2,093 | 2,093 | 2,16 NS |
| Tratamentos | (6) | 30,1522 | 5,025 | 5,19 ** |
| Erro | 63 | 60,994 | 0,978 | |

** Significativo ($P < 0,01$) pelo Teste F. NS Não Significativo ($P > 0,05$).

Na Tabela 2 apresenta-se o desdobramento da interação significativa entre reguladores de crescimento e concentração dos reguladores para a variável número de ES, observando superioridade do regulador de crescimento ANA no número de ES.

Tabela 2. Valores médios referentes ao número de embriões somáticos em amendoim, induzidos em diferentes concentrações de reguladores de crescimento aos 30 dias após o cultivo.

| Regulador de crescimento | Concentração (mg.L ⁻¹) | |
|--------------------------|------------------------------------|---------|
| | 15 | 35 |
| 2,4 - D | 1,60 aA | 1,00 bA |
| ANA | 1,43 aB | 2,93 aA |
| 2iP | 1,00 aA | 1,00 bA |

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna e maiúscula em cada linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letra maiúscula compara entre concentração e minúscula entre reguladores.

Em muitas espécies, o processo de iniciação da embriogênese somática se verifica ao se cultivar o explante em meio de cultura com concentração relativamente elevada de 2,4-D, e as citocininas podem favorecer a formação de calo embriogênico (GUERRA et al., 1999). Porém, pode-se observar que alta concentração de 2,4-D foi inibitória para a indução dos embriões somáticos (Tabela 2). Todos os reguladores utilizados para indução dos embriões na concentração de 15 mg.L^{-1} não diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey. Já na concentração de 35 mg.L^{-1} , os reguladores 2,4-D e 2iP se mostraram estatisticamente semelhantes em relação à média de embriões somáticos induzidos, enquanto o ANA se mostrou bastante eficaz na indução dos mesmos, com média de 2,93. Gill e Saxena (1992) induziram e conduziram o desenvolvimento de embriões somáticos em explante de folha e segmento cotiledonares de amendoim com o uso de 22 mg.L^{-1} de TDZ.

Os eixos embrionários foram induzidos em meio MS, e após 30 dias de cultivo, observou-se embriogênese somática direta em amendoim nos diferentes tratamentos estabelecidos (Figuras 1 B, C e D). Como pode ser observado na Figura 1, o meio MS sem regulador de crescimento não induziu embriões somáticos (ES), o que vem a corroborar com Zimmermann (2010), que menciona a importância primordial dos reguladores de crescimento na indução de ES.

Na Figura 1 observa-se a diferença entre os aspectos morfológicos de cada tratamento estabelecido. O tratamento sem regulador de crescimento (Figura 1A) apresentou apenas o desenvolvimento dos explantes, sem formação de massa embriogênica e, conseqüentemente, sem indução de embriões somáticos, e os tratamentos em que foram utilizados 15 mg.L^{-1} de 2,4-D (Figura 1B) e 15 mg.L^{-1} e 35 mg.L^{-1} de ANA (Figuras 1C e 1D) desenvolveram calos e, sobre estes, os embriões somáticos. Isto pode ser explicado pelo fato de as auxinas estarem envolvidas diretamente com a iniciação e indução de embriões somáticos.

Schenk e Hildebrandt (1972) afirmaram que baixas concentrações de citocininas foram necessárias para a embriogênese somática na maioria das culturas de dicotiledôneas. Contudo, os resultados obtidos com o 2iP não foram satisfatórios. Este fato é justificado pelo estado fisiológico dos explantes (Figura 2). Os tratamentos com 2iP (15 mg.L^{-1} e 35 mg.L^{-1}) adquiriram um escurecimento dos calos, reafirmando o

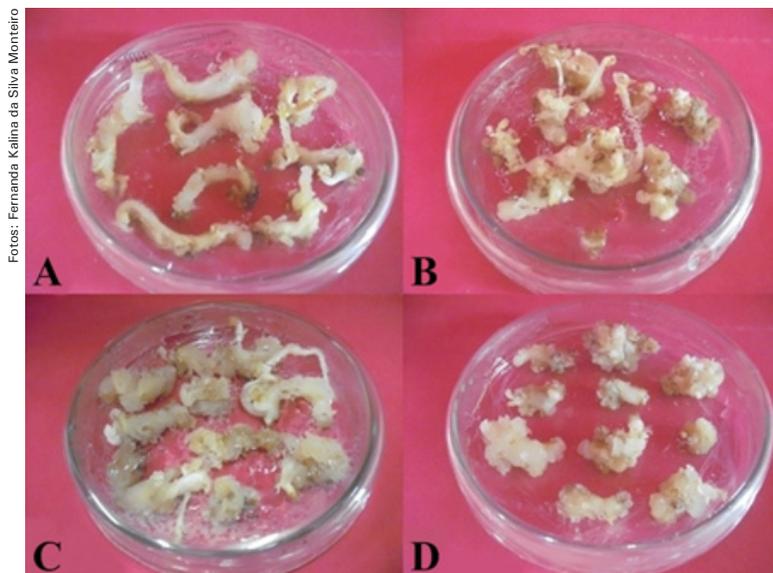


Figura 1. Aspectos de calos em desenvolvimento induzidos em meio MS, nos diferentes tratamentos estabelecidos. A. Sem regulador de crescimento; B. 15 mg.L⁻¹ 2,4-D; C-D. 35 mg.L⁻¹ ANA.

que foi reportado por George (1993), em que essa condição geralmente é inibitória à formação de células competentes à embriogênese, como ocorre também na *Ocotea odorifera* (canela sassafrás) (SANTA-CATARINA et al., 2001).

Na Figura 3 observa-se que os embriões somáticos apresentaram-se transparentes e brancos, em concordância com alguns trabalhos que os descreveram como estruturas brancas (GAGANESAN;

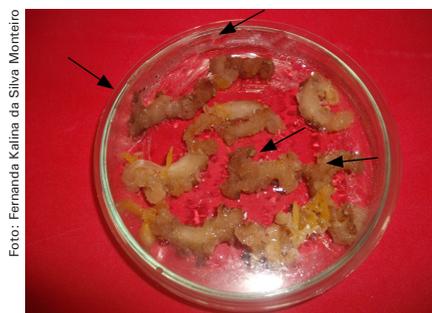
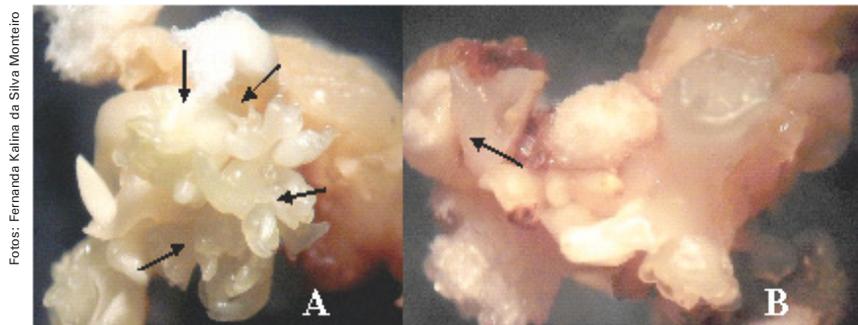


Figura 2. Aspecto fisiológico de explantes cultivados em meios suplementados com 2iP.

JAYABALAN, 2004; BHANUMATHI et al., 2005). Segundo Jurgens e Mayer (1992), o padrão de desenvolvimento de um embrião somático, em dicotiledôneas, apresenta muitas características morfológicas semelhantes as do embrião zigótico, como estádios de desenvolvimento pró-embrionários e embrionários propriamente ditos, que são globulares, cordiforme, torpeda (Figura 3A) e cotiledonar (Figura 3B).



Fotos: Fernanda Kalina da Silva Monteiro

Figura 3. Estádios de embriões somáticos em amendoim, obtidos em meio MS suplementado com 15 mg.L⁻¹2,4-D (3A) e 35 mg.L⁻¹ ANA (3B)

As fases da embriogênese somática é extremamente importante no estudo fisiológico dos embriões, pois é possível observar se o desenvolvimento deles será de forma sincronizada ou se haverá deformação durante o processo ontogenético (PEREIRA et al., 2007). Os estudos mostram que há uma relação de genótipo-dependência nos reguladores utilizados para promover a indução na embriogênese da cultivar estudada, o que se confirma com os achados da literatura (CARVALHO et al, 2006).

As informações obtidas neste trabalho são de grande relevância para a cv. BRS Pérola Branca, que é um genótipo de habito rasteiro, porém, diferentemente das demais cultivares, é altamente precoce e de elevado teor de óleo (SANTOS et al, 2013). Há registros na literatura que em materiais alto-oleicos há uma tendência de dormência nas sementes que, dependendo do caso, pode influenciar no planejamento de colheita. A 'BRS Pérola' tem variações na germinação que, dependendo do local, pode levar até 15 dias. Com a adoção do protocolo adotado, há possibilidade de resgate do genótipo em caso de perda de viabilização da germinação.

Conclusão

O ácido naftaleno acético, na concentração de 35 mg.L⁻¹, é o regulador de crescimento que promove mais benefício para indução de embriões somáticos na cultivar de amendoim BRS Pérola Branca.

Referências

- ALVES, S. A. O. Resgate **in vitro** de híbridos interespecíficos de **dendezeiro (Elaeis guineensis x Elaeis oleifera)**. 2008. 63p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Pará.
- BARRUETO CID, L. P.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: BARRUETO CID, L. P. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. p. 17-43
- BASTOS, L.P. et al. Cultivo in vitro de mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl.2, p.1122-1124, 2007. Disponível em: <<http://www6.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/viewFile/888/731>>. Acesso em: 12 abr. 2011.
- BHANUMATHI, P.; GANESAN, M.; JAYABALAN, N. A simple and improved protocol for direct and indirect somatic embryogenesis of peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Journal of Agricultural Technology**, v.1, n.2, p. 327-344, 2005. Disponível em: <http://www.ijat-aatsea.com/pdf/pdf2/WAT06_2005.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2014.
- BISCH, P.M. **Genoma funcional**. In: MIR, L. **Genômica**. Ed. Atheneu, São Paulo, 2004. p.159-162
- CARVALHO, J. M. F.; VITAL, M. S. **Noções de Cultivo de Tecidos Vegetais**. Campina Grande, PB: Embrapa Algodão, 2003. 41p. (Embrapa Algodão. Documento, 116).
- CARVALHO, J. M. F.; LIMA, M. A.A.; AIRES, P..S.S.; VITAL, M. S.; PIMENTEL, N.W. **Embriogênese Somática**. Campina Grande, PB: Embrapa Algodão, 2006. 35p. (Embrapa Algodão. Documento, 152).
- CASTRO, L. M. de; MOURÃO FILHO, F. de A. A.; MENDES, B. M. J.; MIYATA, L. Y. **Embriogênese somática a partir de calos de cultivares de laranja doce**. Ciência Rural, v.40, n.8, 1-4 p. agosto, 2010.

CHUGH, A.; KHURANA, P. **Gene expression during somatic embryogenesis – recent advances**. Current Science, v. 83, n. 6, p. 715-730. Setembro, 2002.

ELHITI, M; STASOLLA, C. The use of zygotic embryos for in vitro propagation: an overview. In: THORPE; YEUNG, E. C. (eds.) **Plant Embryo Culture: methods and protocols**. Methods in Molecular Biology, v. 710, p. 229-253, 2011.

ENGELMANN, F. *In vitro* conservation methods. In: FORD-LLOYD, B. V.; NEWBURY, H. J.; CALLOW, J. A. (Eds.). **Biotechnology and Plant Genetic Resources: conservation and use**. CABI, UK, 1997. p. 119-161

FERREIRA, M. A.; CALDAS L. S.; PEREIRA E. A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa SPI: Embrapa CNPH, 1998. v. 1, p. 21-43.

FREIRE, R. M. M.; NARAIN, N.; MIGUEL A. M. R. de O.; SANTOS, R. C. dos. Aspectos nutricionais do Amendoim e seus derivados. In: SANTOS, R. C. dos; FREIRE, R. M. M.; LIMA, L. M. (Eds.). **O Agronegócio do Amendoim no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. p. 391-419

FURTADO, C. M.; CARVALHO, J. M. F. C.; CASTRO, J. P.; SILVA, H. **Comparação da frequência de regeneração *in vitro* do amendoim (*Arachis hipogaea*), utilizando diferentes citocininas**. Revista de Biologia e Ciências da Terra, v.7, n. 1, p. 51-58, 2007.

GANESAN, M. JAYABALAN, N. Evaluation of haemoglobin (erythrocyte): for improved somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR. **Plant Cell Report**, v. 23 n.4, p. 181-187, 2004.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C. CALDAS, L.S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPH, 1998. v.1, p.99-169.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. 2.ed., Edington: Exegetics, 1993. v.1.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Edington: Exegetics, 1996. v..20 1574 p.

GILL, R. SAXENA, P.K. Direct somatic embryogenesis and regeneration of plants from seedling explants of peanut (*Arachid hypogaea*): Promotive role of thidiazuron. **Canadian Journal of Botany**. Ottawa, v.70. p. 1186-1192, 1992.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. Plant tissue culture procedure: background. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. (Ed). **Plant propagation by tissue culture**. Dordrecht: Springer, 2008. v.1, p. 1-28.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S., BUSO, J. A. (Eds.) **Culturas de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CBAB, 1999. v. 2, p. 533-568

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Apostilha de biotecnologia. 2006

HOGBERG, K. A.; EKBERG, I.; NORELL, L.; VON ARNOLD, S. Integration of somatic embryogenesis in a tree breeding programme: a case study with *Picea abies*. **Can. J. For. Res.**, v. 28, p.1536-1545, 1998.

JIMÉNEZ, V. M. **Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis**. *Plant Growth Regulation* v.47, p.91–110, 2005.

JUNQUEIRA, C. S.; SOUZA, C. W.; TEIXEIRA, J. B. Regeneração de embriões a partir de calo embriogênico friável do tipo HFSE de duas espécies de café (*Coffea canéfora*, *Coffea arábica*). In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés Brasil, 2, 2001, Vitoria. Anais Cafeeira, 3. 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: IAPAR/CIRAD,. 1999, p.

JURGENS, G., MAYER, U. **Arabidopsis**. In: BARD, J. (Ed.). **Embryos: a colour atlas of developing embryos**. London: Wolfe, 1992. p. 32-37.

MOURA, E. F. **Embriogênese somática em bocaiúva: indução, regeneração e caracterização agrônômica**. 2007. 66 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473 – 497, 1962.

PAIS, M. S. S. Biotecnologia vegetal. In LIMA, N.; MOTA, M. **Biotecnologia: fundamentos e aplicações**. Lisboa, Portugal: Ed. LIBEL, 2003. P. 401-427.

PEREIRA, A. R.; CARVALHO, S. P.; PASQUAL, M.; SANTOS, F. C. Embriogênese somática direta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Acaiá Cerrado: efeito de citocinina e ácido giberélico. **Ciência Agrotécnica**, v.31, n 2, p. 332- 336, 2007.

RAZDAN, M. K. **Introduction to plant tissue culture**. Enfield: Science, 2003. 375 p.

REZENDE, J. C.; CARVALHO, C. H. S.; SANTOS, A. C. R.; PASQUAL, M.; MENDES, A. N. G. Influência De Auxina E Citocinina no Desenvolvimento De Embriões Somáticos De *Coffea arabica* L. **Plant Cell Cult. Micropropag**, Lavras, v.7, n.1, p. 1-8, 2011

SANTA-CATARINA, C.; MACIEL, S.C.; PEDROTTI, E.L. Germinação *In Vitro* E Embriogênese Somática A Partir De Embriões Imaturos De Canela Sassafrás (*Ocotea odorifera* Mez). **Revista Brasileira De Botânica**, São Paulo, v. 24, n.4 (suplemento), p. 501-510, dez. 2001.

SANTOS, R. C. dos; GODY, I. J.; FAVERO, A. P. Melhoramento do amendoim e cultivares comerciais. In: SANTOS, R. C. dos; FREIRE, R. M. M.; LIMA, L. M. (Eds.). **O Agronegócio do Amendoim no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. p.117-184

FREIRE, R. M. M.; NARAIN, N.; MIGUEL A. M. R. de O.; SANTOS, R. C. dos. Aspectos nutricionais do Amendoim e seus derivados. In: SANTOS, R. C. dos; FREIRE, R. M. M.; LIMA, L. M. (Eds.). **O Agronegócio do Amendoim no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. p. 391-419

SCHENK, R. O.; HILDEBRANT, A. C. Medium and Techniques for Induction and Growth of Monocotyledoneous Plant Cell Cultures. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 50, p. 199-204, 1972.

ZIMMERMANN, M. J. **Embriogênese Somática**. In.: BARRUETO CID, L. P. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, 2010. p. 67-86

Embrapa

Algodão

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PÁTRIA EDUCADORA

CGPE: 12102