

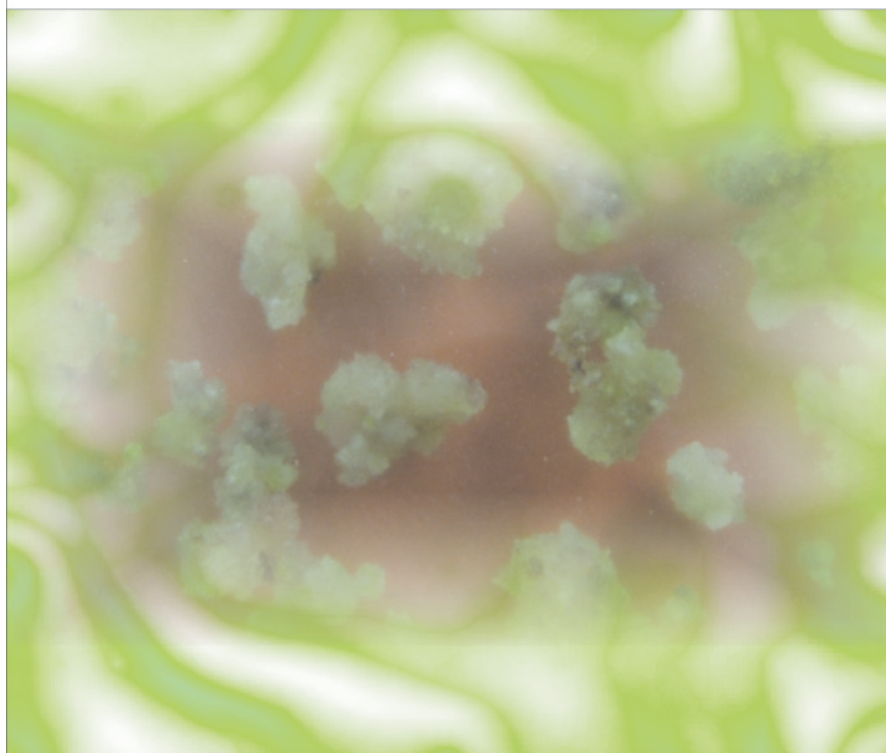
Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento

**Documentos**

ISSN 0103 - 0205  
Setembro, 2006

**152**

Embriogênese Somática



**Embrapa**

**República Federativa do Brasil**

*Luiz Inácio Lula da Silva*  
Presidente

**Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

*Luís Carlos Guedes Pinto*  
Ministro

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**

**Conselho de Administração**

*Luis Carlos Guedes Pinto*  
Presidente

*Silvio Crestana*  
Vice-Presidente

*Alexandre Kalil Pires*

*Hélio Tollini*

*Ernesto Paterniani*

*Cláudia Assunção dos Santos Viegas*

Membros

**Diretoria Executiva da Embrapa**

*Silvio Crestana*  
Diretor-Presidente

*Tatiana Deane de Abreu Sá*

*José Geraldo Eugênio de França*

*Kepler Euclides Filho*

Diretores Executivos

**Embrapa Algodão**

*Robério Ferreira dos Santos*  
Chefe Geral

*Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão*  
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

*Maria Auxiliadora Lemos Barros*  
Chefe Adjunto de Administração

*José Renato Cortez Bezerra*  
Chefe Adjunto de Comunicação e Negócios



ISSN 0103-0205  
Setembro, 2006

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro Nacional de Pesquisa de Algodão

## **Documentos 152**

### **Embriogênese Somática**

Julita Maria Frota Chagas Carvalho  
Marleide Magalhães de A. Lima  
Priscila Simone Ribeiro Aires  
Márcia Soares Vidal  
Nara Wanderley Pimentel

Campina Grande, PB.  
2006

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

**Embrapa Algodão**

Rua Osvaldo Cruz, 1143 – Centenário  
Caixa Postal 174  
CEP 58107-720 - Campina Grande, PB  
Telefone: (83) 3315-4300  
Fax: (83) 3315-4367  
algodao@cnpa.embrapa.br  
http://www.cnpa.embrapa.br

**Comitê de Publicações**

Presidente: Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão

Secretária: Nívia Marta Soares Gomes

Membros: Cristina Schetino Bastos

Fábio Akiyoshi Suinaga

Francisco das Chagas Vidal Neto

Luiz Paulo de Carvalho

José Américo Bordini do Amaral

José Wellington dos Santos

Nair Helena de Castro Arriel

Nelson Dias Suassuna

Supervisor Editorial: Nívia Marta Soares Gomes

Revisão de Texto: Julita Maria Frota Chagas Carvalho

Tratamento das Ilustrações: Geraldo Fernandes de Sousa Filho

Capa: Flávio Tôrres de Moura/Maurício José Rivero Wanderley

Editoração Eletrônica: Geraldo Fernandes de Sousa Filho

**1ª Edição**

1ª impressão (2006) 1.000 exemplares

**Todos os direitos reservados**

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

---

EMBRAPA ALGODÃO (Campina Grande, PB)

Embriogênese Somática, por Julita Maria Frota Chagas Carvalho e outros.

Campina Grande, 2006

35p. (Embrapa Algodão. Documentos, 152)

1. Biotecnologia. I. Carvalho, J.M.F.C. II. Lima, M.M. de A. III. Aires, P.S.R.  
IV. Vidal, M.S. V. Pimentel, N.W. VI. Título. VII. Série.

CDD620.8

---

© Embrapa 2006

## **Autores**

### **Julita Maria Frota Chagas Carvalho**

Eng. Agr., DSc., Embrapa Algodão, CP 174, CEP 58107-720,  
Campina Grande, PB. E-mail: julita@cnpa.embrapa.br

### **Marleide Magalhães de A. Lima**

Eng. Fl., Dr. da Embrapa Algodão, CP 174, CEP 58107-720,  
Campina Grande, PB. E-mail: marleide@cnpa.embrapa.br.

### **Priscila Simone Ribeiro Aires**

Estagiarias da Embrapa Algodão graduada do curso de Ciência  
Biológica da UEPB

### **Márcia Soares Vidal**

Bióloga, DSc., Embrapa Agrobiologia, Rodovia BR 465, Km 07, CP  
74505, CEP 23890-000, Seropédica, RJ. E-mail:  
marcia@cnpab.embrapa.br

### **Nara Wanderley Pimentel**

Estagiarias da Embrapa Algodão graduada do curso de Ciência  
Biológica da UEPB



## **Apresentação**

Uma das ferramentas da biotecnologia é sem dúvida a micropropagação que envolve a obtenção de embrióides, via embriogênese somática, que tanto podem ser utilizados a nível comercial, como já é feito com várias culturas, especialmente fruteiras, como os casos da bananeira e do abacaxizeiro, bem como para auxiliar no melhoramento genético de plantas, reduzindo o tempo para a obtenção de cultivares de melhor desempenho global.

Robério Ferreira dos Santos  
Chefe Geral da Embrapa Algodão





## Sumário

Embriogênese Somática.....	11
Introdução.....	11
Principais Aspectos .....	13
Meios de Cultivo .....	15
Efeito de reguladores endógenos .....	16
Efeito de Fitorreguladores .....	18
Embriogênese somática aplicada em diferentes espécies vegetais ...	20
Embriogênese somática aplicada no algodão .....	21
Considerações finais .....	24
Referências Bibliográficas .....	25



## **Embriogênese Somática**

---

Julita Maria Frota Chagas Carvalho  
Marleide Magalhães de A. Lima  
Priscila Simone Ribeiro Aires  
Márcia Soares Vidal  
Nara Wanderley Pimentel

### **Introdução**

As modernas aplicações da biotecnologia vegetal têm-se constituído em complementos indispensáveis ao fitomelhoramento, propiciando várias possibilidades para o aumento da produção, da produtividade e da diversificação das culturas, incluindo-se o uso de biopesticidas, técnicas de cultivo de tecidos e de instrumentos avançados da genômica e da engenharia genética.

Como em toda ciência decorrem produtos tecnológicos que podem ser obtidos, o uso inadequado da biotecnologia também pode proporcionar danos irreparáveis ao meio ambiente e à saúde humana, além de provocar uma grande polêmica visto que implica em questões de ordem ética e moral (AMBIENTE BRASIL, 2005).

Uma das áreas da biotecnologia hoje bastante estudada e aplicada, é o cultivo de tecido vegetal que, segundo Carvalho (1999) teve início nos anos 30 porém só tomou impulso realmente nos anos 70, com interesse na área de melhoramento genético e nas técnicas de micropropagação.

A micropropagação é uma técnica através da qual se propaga plantas dentro de tubos de ensaios ou similares de vidro, sob condições adequadas de assepsia, nutrição e fatores ambientais, como luz, temperatura, oxigênio

e gás carbônico. A cultura *in vitro* de plantas é uma das técnicas mais polivalentes no campo da biotecnologia (CID, 2001).

A micropropagação *in vitro* é a aplicação mais prática da cultura de tecido e aquela de maior impacto (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998) haja vista permitir condições para se obterem plantas de difícil propagação e de ciclos de vida longa, em menor espaço de tempo, comparativamente ao melhoramento convencional; trata-se de uma forma de reprodução assexuada, em que se utilizam explantes do vegetal os quais, por meio de divisões celulares induzidas pelos hormônios vegetais e pelos fitorreguladores, produzem grande quantidade de indivíduos, genética e fenotipicamente idênticos, podendo ser conduzida pela proliferação de gemas axilares, indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta, e embriogênese somática, direta ou indireta.

Assim, a técnica de clonagem *in vitro* de plantas tornou-se possível mediante a cultura de tecidos, fundamentando-se na totipotência das células vegetais, por meio da regeneração *in vitro*, via organogênese ou embriogênese somática, para originar as novas plantas.

A Embriogênese Somática (ES) desempenha um significativo papel na transformação genética, hibridização somática e variação somaclonal, considerando-se que a expressão diferencial de um gene em células somáticas envolve a mudança na programação de desenvolvimento dessas células, conferindo-lhes a capacidade de manifestar o potencial embriogênico (ZENG et al., 2006).

Teoricamente, a ES é a melhor opção para a propagação *in vitro*, em virtude de apresentar vantagens, como alta taxa de multiplicação comparada a qualquer outro processo de propagação, escalonamento da produção pela manutenção da cultura em meio líquido; plantio direto da muda obtida via ES, sem necessidade de enxertia, com menor custo de produção, além da planta ser geneticamente igual à planta-mãe; possibilidade de transferência de genes, razão pela qual tem sido utilizada como ferramenta em estudos de desenvolvimento de plantas, propagação

clonal e melhoramento ([http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio07/7\\_f.asp](http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio07/7_f.asp)).

A ES é, portanto, o meio pelo qual células somáticas se desenvolvem em estruturas que se assemelham a embriões zigóticos (isto é, bipolar e sem conexão vascular ao tecido parental) com uma série de estádios embriológicos característicos, sem fusão de gametas (JIMÉNEZ, 2001) e foi descrito há quase 50 anos (STEWART et al., 1958), devido à sua relevância.

### Principais Aspectos

Os fatores que influem no êxito do cultivo de tecidos estão relacionados à origem e ao tipo de material vegetal, destacando-se a idade da planta, o tipo de explante (ápices caulinares, hipocótilos, discos foliares, segmentos foliares e raízes, entre outros), a posição que este explante ocupa na planta e uma vasta lista de aspectos que, em sua totalidade, dificilmente poderão ser controlados, pois cada variedade reage ou responde de maneira diferente (CARVALHO, 1999).

A ES *in vitro* foi observada, de início em 1958, em cultivo de células isoladas de raiz de cenoura (STEWART, 1958); posteriormente, foi iniciada em um grande número de espécies (BAJAJ, 1995) e consiste na formação de embriões somáticos a partir de tecidos somáticos; neste processo, as células ou tecidos somáticos (não sexuais) se desenvolvem até a formação completa de uma planta, por meio de uma série de estádios, característicos do desenvolvimento de embriões zigóticos; a partir de uma célula que se multiplica, organiza-se uma estrutura semelhante ao embrião que existe na semente normal). A ES pode ser realizada de forma direta ou indireta, ou seja, o embrião somático se origina diretamente do explante ou se desenvolve de células de calo, depois de um período mais ou menos longo de proliferação. O embrião se forma a partir de células embriogênicas, as quais se distinguem das outras células do calo devido ao aspecto similar às células meristemáticas; assim, são pequenas,

isodiamétricas, pouco vacuoladas, ricas em citoplasma, com núcleos evidentes e paredes delgadas (GUERRA, 1999).

Para que ocorra o processo de ES, as células diferenciadas devem, antes de tudo, ser desdiferenciadas depois da divisão celular, para serem determinadas como células embriogênicas e posteriormente serem rediferenciadas (PASQUAL et al., 1997). No interior, as células somáticas adquirem características embriogênicas por meio de uma completa reorganização do estágio celular, incluindo a fisiologia, o metabolismo e a expressão gênica (FEHÉR et al., 2002); tradicionalmente, a ES é dividida em dois estádios principais: indução e expressão. Em geral, depois de uma mudança nas condições de cultura, por exemplo, meio de cultura, composição de fitorreguladores, fonte de hidrato de carbono ou potencial osmótico, é que os tecidos ou as células induzidas alcançam o estágio de expressão no qual as células indicam as suas competências, diferenciando-se em embriões somáticos, que são estruturas independentes bipolares, com um ápice radical e outro caulinar, ocorrendo uma conexão entre os dois extremos, mediante o procâmbio que, finalmente, origina os tecidos vasculares (Ammirato), 1986

As mudanças no desenvolvimento do embrião são visíveis, passando pelos estádios típicos da embriogênese zigótica, isto é, estágio globular, codiforme e torpeda, em dicotiledôneas; globular e cotiledonar, em monocotiledôneas; globular, cotiledonares precoces e tardios, em coníferas (TOONEN e VRIES, 1996; DONG e DUNSTAN, 2000); referidas estruturas terminam por se converter em plantas completas, através de uma série de processos que correspondem aos que ocorrem nos embriões zigóticos (TISSERAT et al., 1979).

Uma fase importante no desenvolvimento do embrião, tanto no zigótico como no somático, é o processo de maturação, fase em que ocorrem várias mudanças morfológicas e bioquímicas, evidentes pela deposição de materiais armazenados, pela interrupção da germinação e pela tolerância à dissecação, principalmente em espécies com sementes ortodoxas (THOMAS, 1993; MCKERSIE e BROWN, 1996). Há diversos casos em

que os embriões somáticos cultivados não se desenvolvem normalmente, não germinam nem se convertem em plantas normais, enquanto em outros o desenvolvimento e a maturação do embrião são interrompidos pela germinação precoce, conduzindo à ocorrência de plântulas mal desenvolvidas. Grandes esforços têm sido devotados para se contornar esses problemas, sobretudo pela suplementação dos meios de cultura com fitorreguladores que favorecem as últimas fases da ES, para que progrida similarmente àquelas da embriogênese zigótica.

### **Meios de Cultivo**

A composição do meio nutritivo, além de conter nutrientes necessários à sobrevivência da planta, é imprescindível para favorecer o crescimento e o desenvolvimento do material vegetal; constitui-se, basicamente, de sais minerais, macronutrientes e micronutrientes, para garantir o suprimento de elementos minerais, e de uma fonte de carbono, como: açúcar, sacarose, glicose ou sorbitol, entre outros, de vitaminas e de outros suplementos orgânicos (CID, 2001).

Dentre as inúmeras formulações de meios de cultura, o mais difundido é o meio MS, idealizado por Murashige e Skoog (MURASHIGE e SKOOG 1962) que, segundo Mantell et al. (1994), foi aperfeiçoado ponto de ser um dos mais amplamente utilizados em trabalhos de cultura de tecidos, constituindo-se das seguintes substâncias:

- Macronutrientes inorgânicos (N, K, Ca, Mg, P, S, Si)
- Micronutrientes inorgânicos (Cl, Fe, B, Mn, Na, Zn, Cu, Ni, Mo)
- Vitaminas (ácido nicotínico, piridoxina e tiamina)
- Fontes de nitrogênio orgânico (glicina e inositol)
- Açúcares (sacarose, glucose e monitol, entre outros)
- Reguladores de crescimento (auxina, citocinina, ácido giberélico)
- Orgânicos opcionais (hidrolizado de caseína e extrato de levedura)
- Agente gelatinoso opcional (ágar ou phytigel).

A consistência do meio de cultura pode ser ajustada pela adição de agentes gelificantes. Os cultivos em meio líquido devem ser mantidos sob agitação para assegurar a aeração dos explantes; outra possibilidade é inocular o explante sobre um suporte de algodão ou ponte de papel, evitando que fiquem submersos (WILLADINO e CÂMARA, 2005).

### **Efeito de reguladores endógenos**

Todos os vegetais possuem, naturalmente, em sua composição algumas substâncias químicas, como auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico, cujo propósito é regular os processos metabólicos envolvidos no crescimento e desenvolvimento, não possuindo função nutricional; são substâncias ativas em concentrações muito baixas nos tecidos e conhecidas como hormônios ou substância de crescimento (PASQUAL, et al.1997).

De acordo com Kumria et al. (2003), dentre os muitos aspectos relacionados à ES não compreendidos inteiramente, cita-se a participação de hormônios e de reguladores de crescimento da planta para determinar a conversão de tecidos somáticos embriogênicos e permitir a progressão e a maturação de embriões somáticos (JIMÉNEZ, 2005).

O nível de hormônios é considerado como um dos fatores cruciais que determinam o potencial embriogênico dos explantes (FEHÉR et al., 2003; GAJ, 2004). Os tecidos de explantes como fonte de material para indução da ES são diversos, dependendo sobretudo da espécie em estudo. Há plantas muito responsivas, a exemplo da cenoura, em que praticamente qualquer parte pode ser usada para estabelecer culturas embriogênicas (JIMÉNEZ et al., 2005), e outras mais recalcitrantes, em que apenas explantes muito específicos, geralmente juvenis, são responsivos.

A sensibilidade às auxinas pode explicar, ao menos parcialmente, diferenças na resposta entre as espécies de plantas, genótipos ou células em mesmos explantes ou em explantes de diferentes origens em sua potencialidade de se transformar em embriogênicas (DUDITS et al., 1995).



As divergências na sensibilidade são, sem dúvida, conseqüência da variação na habilidade de determinados explantes produzirem os receptores apropriados e, assim, continuarem com o padrão de desenvolvimento da embriogênese (GUZZO et al., 1994).

A auxina é considerada o hormônio mais importante na regulação da ES *in vitro* (COOKE et al., 1993); é provável que esta regulação ocorra por meio do estabelecimento de um gradiente de auxina durante a fase de indução somática, que é essencial para iniciar a simetria bilateral durante a embriogênese em embriões somáticos e zigóticos, em dicotiledôneas e em monocotiledôneas (SCHIAVONE e COOKE, 1987; LIU et al., 1993; FISCHER e NEUHAUS, 1996).

A necessidade de auxinas na ES foi estabelecida para diversas plantas. Exemplos de culturas embriogênicas que têm índices mais elevados de auxinas endógenas que suas contrapartes não embriogênicas podem ser encontrados em cenoura (SASAKI et al., 1994; JIMÉNEZ e BANGERTH, 2001a), *Pennisetum purpureum* (RAJASEKARAN et al., 1987b), *Medicago falcata* (IVANOVA et al. 1994), cana-de-açúcar (GUIDERDONI et al., 1995), trigo (JIMÉNEZ e BANGERTH, 2001b) e milho (JIMENEZ e BANGERTH, 2001c).

Apesar do relacionamento entre os níveis de auxina e citocinina em determinar as propriedades da ES, como os postulados para *Pennisetum purpureum* (RAJASEKARAN et al., 1987a), não poderiam ser extrapolados para outras espécies devido à particularidade de cada indivíduo (JIMENEZ e BANGERTH, 2001a,b,c).

Relatos em anis (ERNST e OESTERHELT, 1985) e em uva (JIMENEZ e BANGERTH, 2000) indicam que os níveis de citocinina podem estar mais relacionados ao crescimento de calos das culturas que na competência da embriogênese. Pinto et al. (2002) encontraram níveis de citocininas mais elevados em calos não embrionários que em calos embrionários, em *Medicago arborea*.

Os níveis endógenos do ácido abscísico parecem ser significativos para a iniciação de culturas embrionárias, especialmente em algumas monocotiledônes (BHASKARAN e SMITH, 1990) e também em cenoura (KIYOSUE et al., 1993); favorecendo esta hipótese, observaram-se níveis mais elevados de ácido abscísico em linhas de calos embriogênicos, quando comparados aos não embriogênicos em cenoura (JIMENEZ e BANGERTH, 2001a), em cana de açúcar (GUIDERDONI et al., 1995) e em uva (JIMENEZ e BANGERTH, 2000); entretanto, em *Hevea brasiliensis* (ETIENNE et al., 1993) e em alfafa (IVANOVA et al., 1994), as culturas de calos embrionários acumularam níveis mais baixos de ácido abscísico que suas contrapartes não embriogênicas.

A interação entre hormônios e fitorreguladores foi proposta mediante o mecanismo pelo qual o tidiazuron induz a ES em amendoim; esta citocinina modula, aparentemente, níveis endógenos das auxinas e das citocininas, que causaram o efeito observado (MURTHY et al., 1995), fato apoiado pela redução nos índices endógenos de IAA e de BAP causados pelo tidiazuron em culturas de calos de *Scutellaria baicalensis* (ZHANG et al., 2005).

### Efeito de Fitorreguladores

Os fitorreguladores são substâncias sintéticas que, aplicadas a plantas inteiras ou a segmentos de tecidos vegetais, provocam atividades fisiológicas similares aos hormônios vegetais (PASQUAL, 1997). Diversas observações acatam a premissa de que fitorreguladores adicionados exercem a parte de seu efeito, modificando as concentrações de hormônios endógenos (GASPAR et al., 2003).

A importância dos hormônios vegetais e dos fitorreguladores nos estádios da ES foi documentada extensamente durante as últimas décadas (JIMÉNEZ, 2005). A maioria dos estudos sobre a participação de compostos na ES, foi conduzida com grupos 'clássicos', isto é, auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno. Das outras substâncias

que compartilham de algumas características desses hormônios e que, mais recentemente, foram incluídos neste grupo - jasmonatos, ácido salicílico e poliaminas - há evidências de que as poliaminas participem da ES.

Na maioria das espécies estudadas, a adição de fitorreguladores é necessária para induzir a ES; as auxinas e as citocininas são fatores chaves na determinação da resposta da embriogênese, provavelmente porque participam fortemente na regulação do ciclo e da divisão celular (FRANCIS e SORRELL, 2001; FEHÉR et al., 2003). Gaj (2004) constatou que em mais de 80% dos protocolos, a ES foi induzida na presença de auxinas ou em combinação com citocininas, mas o ácido abscísico, o etileno, o ácido giberélico e outros hormônios, têm papéis regulatórios que não devem ser ignorados em sistemas de cultura; por outro lado, uma nova geração de fitorreguladores está emergindo como alternativa bem sucedida na regeneração direta de alta frequência de embriões somáticos uniforme, de tecidos de explantes bem diferenciados (GAIRI e RASHID, 2004 a, b; PANAI et al., 2004; ZHANG et al., 2005).

O efeito de ácido giberélico exógeno aplicado na ES é altamente variável de uma espécie para outra ou de tecido para tecido; por exemplo, quando o ácido giberélico foi adicionado ao meio de cultura, principalmente na forma de GA3, inibiu a ES em cenoura porém a inibição da síntese de ácido giberélico promoveu a ES do embrião preliminar (TOKUJI e KURIYAMA, 2003). Segundo Takeno et al. (1983) e Hutchinson et al. (1997), a aplicação de GA3 exógeno inibiu o desenvolvimento de embriões somáticos na maioria das espécies avaliadas.

Interação positiva do ácido abscísico com carbono ativado no desenvolvimento e na produção de embriões somáticos, foi observada por Pullman et al. (2005), sendo o principal efeito do ácido abscísico exógeno, na progressão da ES e na melhoria da morfologia do embrião; outrossim, plântulas de cenoura cultivadas em meio contendo ácido abscísico, formaram embriões somáticos diretamente de células epidérmicas, sendo que o número de embriões dependeu da sua concentração (NISHIWAKI et al., 2000).

Blöchl et al. (2005) relacionaram o efeito do ácido abscísico na maturação de embriões somáticos de alfafa a um acúmulo de oligossacarídeos, tal como ocorre durante o desenvolvimento tardio de sementes ortodoxas. Apesar dos resultados precedentes, em amendoim a aplicação do ácido abscísico não melhorou a maturação sem a conversão de embrião somático (MHASKE et al., 1998).

A respeito do etileno, níveis mais elevados deste hormônio foram encontrados em culturas não embriogênicas em cenoura (FEIRER e SIMON, 1991). Uma diferença adicional entre as culturas embriogênicas e não embriogênicas pode estar relacionada às taxas de absorção de fitorreguladores exógenos, como relatado em cultivos de trigo de inverno (FILEK et al., 2004).

### **Embriogênese somática aplicada em diferentes espécies vegetais**

A embriogênese somática tem sido uma técnica alternativa com potencial de aplicação na propagação clonal de plantas e em estudos básicos e análise dos eventos moleculares e bioquímicos que ocorrem durante a embriogênese vegetal (MORAES, 2003).

De acordo com Zanol (2000), ES com regeneração de plantas foi obtida a partir de embriões zigóticos maduros de mamoeiro (*Carica papaya* L.) 'Sunrise Solo', utilizando-se frutos originados de flores hermafroditas; a presença de baixa concentração de cinetina no meio de germinação, induziu a formação de embriões normais porém maiores concentrações de cinetina e a presença do ácido giberélico ( $GA_3$ ) induziram à formação de um número maior de embriões com anomalias morfológicas. Almeida et al (2000) estabeleceu um protocolo de ES para o mamoeiro (*Carica papaya* L.) cv. Baixinho de Santa Amália, grupo Solo. A eficiência das fases de indução de calos, indução de embriões, alteração de embriões, alongamento, enraizamento e aclimatação das plântulas foram, respectivamente, 100%, 98%, 44%, 42%, 50% e 80%, para os diferentes meios de cultura utilizados.

Donato et al. (2000) obtiveram calos e embriões somáticos de couve-comum (*Brassica oleracea* L., var. *leucocephala*), caracterizando-os, por meio de observações histológicas, revelando a superioridade da interação entre meios, para a regeneração de calos e embriões somáticos.

Ledo et al. (2002) estudaram diferentes respostas morfogênicas de embriões zigóticos de açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) submetidos a várias condições de cultura *in vitro*, verificando a expressão de ES direta, repetitiva e as não sincronizadas em embriões zigóticos maduros cultivados.

Machado (2004) estabeleceu protocolos eficientes de regeneração e melhoramento de cultivares de mandioca, cultivadas na região Nordeste do Brasil e avaliou sistemas de regeneração via ES, organogênese de brotos e o sistema de transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*. Observaram-se diferenças em relação à capacidade embriogênica das diferentes cultivares e a ES secundária induziu brotos em explantes derivados de cotilédones verdes de embriões somáticos cíclicos.

Lamb et al. (2002) consideram que os calos embriogênicos são tecidos-alvo mais utilizados para transformação genética de cereais e avaliaram o estabelecimento de calos embriogênicos e a regeneração de plantas *in vitro* a partir de embriões maduros de genótipos de aveia observando diferenças entre genótipos quanto à capacidade de ES e regeneração de plantas *in vitro*, a partir de embrião maduro.

### **Embriogênese somática aplicada no algodão**

O algodão é uma das culturas mais importantes geneticamente modificadas; contudo, para obtenção das plantas transformadas, o processo deve ser acompanhado de um sistema eficiente de regeneração.

Os maiores problemas para o êxito das aplicações da biotecnologia em algodão estão na dependência do genótipo e na baixa frequência de ES resultando na dificuldade da regeneração de tecidos transformados (TULLI e KUMAR, 2004).

O sucesso da hibridização entre as espécies selvagens e cultivares de algodão tem sido limitado pela necessidade de resgate do embrião e baixa fertilidade dos híbridos  $F_1$ , dificultando a utilização de certos métodos de melhoramento, embora a regeneração das plantas via ES tenha sido obtida (SUN et al., 2004).

Leelavathi et al. (2004) conseguiram a regeneração de um elevado número elevado de plantas de algodão transgênico (cerca de 83%) a partir de calos embriogênicos, mediante a transformação por *Agrobacterium* conduzindo o gene *cry1a5*; constataram, também ser este o procedimento mais econômico e rápido quando comparado com o uso de hipocótilos ou de folhas cotiledonares como explantes para a transformação.

Com base na capacidade de ES e regeneração das plantas, conclui-se que as variedades de algodão são classificadas em quatro categorias, em que na primeira se acham as variedades com elevada capacidade de ES e regeneração de plantas, tal como Coker 201 e Coker 312, que se têm tornado variedades modelo em cultura de tecidos e transformação genética de algodão; já na segunda, estão as variedades com moderada capacidade de ES e regeneração de plantas, capazes de produzir alguns embriões e plântulas, após alguns subcultivos. Algumas variedades estão incluídas nesta classe, como por exemplo Coker 310, Siokra 1-4 e a Coker 315, dentre outras; a terceira classe possui baixa capacidade de ES e/ou não apresenta regeneração; enquanto a quarta classe inclui alguns genótipos cuja formação de embriões não tem sido observada (RAO et al., 2006).

Zeng et al. (2006) realizaram o isolamento e a caracterização de genes associados à ES em algodão e constataram que o conjunto de cDNA se compõe de uma ampla lista de genes que codificam proteínas envolvidas em respostas inicial e fisiológica da ES, e nos subseqüentes estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos. Este estudo mostrou também que a ES segue uma única via de desenvolvimento regulada por padrões temporal e espacial de expressão gênica.

Carvalho et al. (1998) avaliaram o comportamento das cultivares CNPA Precoce 2 e Coker 312 com relação à ES em diferentes meios de cultivo e notaram que não só a cultivar CNPA Precoce 2 mas também a quanto Coker 312, produziram calos embriogênicos que formaram embrióides.

Sun et al. (2005) obtiveram plantas regeneradas através de ES de protoplastos de algodão diplóide com homogeneidade genética constatada pelo padrão de bandas RAPD.

De acordo com Sakhanokho et al. (2005), progressos recentes em ES foram alcançados em várias linhas de algodão de germoplasma da Geórgia, em cultura contendo várias concentrações de Putrescine.

Ganesan e Jayabalan (2004) verificaram que a ES em *G. hirsutum* é acelerada quando a regeneração das plantas ocorre em meio suplementado com hemoglobina, possibilitando a obtenção da planta regenerada em seis a sete meses. O efeito da hemoglobina foi relacionado com atividades de enzimas antioxidantes na regeneração; no entanto, as cultivares testadas responderam de maneira diferente ao emprego da hemoglobina.

Rakitin et al. (2001) constataram que o efeito morfogênico de oligossacarídeos adicionados ao meio de cultivo resulta em ação anti-auxina, estimulando a embriogênese em algodão pela inibição da síntese de etileno dependente da auxina.

Ganesan e Jayabalan (2005) obtiveram alta taxa de ES em *G. Hirsutum*, cv. SVPR2, em meio MS suplementado com Picloran, cinetina e maltose.

Zhang, et al. (2000) tiveram sucesso com indução da ES e regeneração de plantas nas cultivares Coker 201 e CRI12, utilizando carvão ativado e zeatina.

Zhang, et al. (2001) verificaram que a Canamicina inibe o crescimento e a proliferação de calos embrionários, a iniciação e o desenvolvimento de embriões somáticos de algodão, mas a seleção de plantas de algodão transgênico quando a canamicina é utilizada como agente seletivo é bastante discutida.

## Considerações finais

A embriogênese é uma técnica de grande aceitabilidade e aplicação, para estudos relacionados às diversas áreas, fisiologia, genética e bioquímica.

Embora visíveis, os avanços da biotecnologia e dos estudos relacionados à ES, a compreensão dos estímulos e condições ideais à indução, no que se refere ao conhecimento sobre os mecanismos pelos quais os hormônios da planta são envolvidos na regulação e no controle deste processo ainda são limitados.

Postula-se que o uso de distintas metodologias para purificar extratos e quantificar hormônios de plantas é, pelo menos parcialmente, responsável pelas diferenças relatadas em vários trabalhos. Considerando-se que as metodologias hoje empregadas são altamente confiáveis, é provável que as diferenças encontradas entre os resultados de pesquisas decorram da diversidade genotípica entre as espécies ou mesmo cultivares, além da fisiologia dos explantes.

Diversos trabalhos realizados com genótipos comerciais e silvestres de algodão têm relatado a capacidade de ES de diferentes partes da planta; contudo, segundo Guerra et al. (1999), para que a ES venha a ser o sistema de micropropagação do futuro, é necessário que ocorram melhorias nos protocolos regenerativos, a fim de se obter grandes quantidades de pró-embriões em biorreatores ou equipamentos similares.

Ressalta-se que a identificação de genes associados à ES é um recurso importante para o entendimento das interações genéticas fundamentais à sinalização e regulação das respostas, podendo contribuir para a caracterização do processo de ES em plantas.



## Referências Bibliográficas

ALMEIDA, E.P. de; OLIVEIRA, R.P. de; DANTAS, J.L.L. Protocolo para a embriogênese somática do mamoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.10, p.2017-24, out.2000.

AMBIENTE BRASIL. Disponível em: [www.ambientebrasil.com.br](http://www.ambientebrasil.com.br). Acesso: 10 nov. 2005.

AMMIRATO, P.V. Control and expression of morphogenesis in culture. In: WITHERS, L.S.; ALDERSON, P.G. (Eds). **Plant tissue culture and its agricultural applications**. London: Butterworths, 1986. p.23-45.

BAJAJ, Y. P. S. Somatic embryogenesis and its application for crop improvement. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed). Somatic embryogenesis and synthetic seeds. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, Berlin, v.3, p.87-101, 1995.

BHASKARAN S.; SMITH R.H. Regeneration in cereal tissue culture: a review. **Crop Science**, v.30, p.1328–1337, 1990.

BIOTECNOLOGIA: Ciência & Desenvolvimento. Disponível em: [www.biotecnologia.com.br/revista/bio07/7\\_f.asp](http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio07/7_f.asp). Acesso em: 10 nov. 2005.

BLÖCHL, A.; GRENIER, de M. G.; SOURDIOUX, M.; PETERBAUER T.; RICHTER, A. Induction of rabinose oligosaccharide biosynthesis by abscisic acid in somatic embryos of alfafa (*Medicago sativa* L.). **Plant Science**, v.168, p.1075–1082, 2005.

CARVALHO, J.M.F.C. **Técnicas de micropropagação**. Campina Grande: Embrapa - CNPA, 1999. 39 p.( Embrapa-CNPA. Documento, 64).

CARVALHO, J.M.F.C; BENITO, E.G; PEREZ, C; SANTOS, J.W. Resposta de duas cultivares de algodão à embriogênese somática em diferentes meios de cultivo. **Revista de Oleaginosas e Fibras**, v.2. n.1,p.13-19, 1998.

CID, L.P.B. A propagação *in vitro* de plantas. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 2, n.19, p.16-21, 2001.

COOKE, T.J.; RACUSEN, R.H.; COHEN, J.D. The role of auxin in plant embryogenesis. **Plant Cell**, v.5, p.1494–1499, 1993.

DONATO, V.M.T.S.; ANDRADE, A.G. de; CABRAL, J.B.; ALVES, G.D. Embriogênese somática *in vitro* em couve-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.4, p.711-718, abr. 2000.

DONG, J.Z.; DUNSTAN, D.I. Molecular biology of somatic embryogenesis in conifers. In: JAIN, S.M.; MINOCHA, S.C. (Eds), **Molecular biology of woody plants**. Dordrecht : Kluwer Academic, 2000. p. 51–87.

DUDITS, D.; GYÖRGYÉY, J.; BÖGRE, L.; BAKÓ, L. Molecular biology of somatic embryogenesis. In: Thorpe, T.A. (Ed.), **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 276–308.

ERNST, D.; OESTERHELT, D. Changes of cytokinin nucleotides in an anise cell culture (*Pimpinella anisum* L.) during growth and embryogenesis. **Plant Cell Report**, v.4, p.140–143, 1985.

ETIENNE, H.; SOTTA, B.; MONTORO, P.; MIGINIAC, E. & CARRON, M.P. Relation between exogenous growth regulators and endogenous indole-3-acetic acid and abscisic acid in the expression of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.). **Plant Science**, v.88, p.91-96, 1993.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.; ÖTVÖS, K.; MISKOLCZI, P.; DUDITS, D. Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. **Biologia**, Bratislava, v.57, p. 5–12, 2002.

- FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.P; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.74, p. 201–228, 2003.
- FEIRER, R.P.; SIMON, P.W. Biochemical differences between carrot inbreds differing in plant regeneration potential. **Plant Cell Report**, v. 10, p. 152–155, 1991.
- FILEK, M.; BIESAGA-KOSCIELNIAK, J.; MARCINSKA, I.; MACHÁCKOVÁ, I.; KREKULE, J. The influence of growth regulators on membrane permeability in cultures of winter wheat cells. **Z. Naturforsch**, v.59c, p. 673–678, 2004.
- FISCHER, C.; NEUHAUS, G. Influence of auxin on the establishment of bilateral symmetry in monocots. **The Plant Journal**, v.9, p.659–669, 1996.
- FRANCIS, D.; SORRELL, D.A. The interface between the cellcycle and plant growth regulators: a mini review. **Plant Growth Regulat**, v.33, p.1–12 2001.
- GAIRI, A.; RASHID A.. Direct differentiation of somatic embryos on different regions of intact seedlings of *Azadirachta* in response to thidiazuron. **Journal of Plant Physiology**, v.161, p.1073–1077. 2004a.
- GAIRI, A.; RASHID, A. TDZ-induced somatic embryogenesis in non-responsive caryopses of rice using a short treatment with 2,4-D. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.76, p. 29–33, 2004b
- GAJ M.D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulat**. v.43, p. 27–47, 2004.
- GANESAN, M.; JAYABALAN, N. Evaluation of haemoglobin (erythrogen): for improved somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR 2). **Plant Cell Report**, v.23, p.181–187, 2004.

GANESAN, M.; JAYABALAN, N. Carbon source dependent somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton, *Gossypium hirsutum* L. c.v. SVPR2 through suspension cultures. **Indian Journal Experimental Biology**, v. v. 43, n.10, p.921-925, 2005.

GASPAR, T.; KEVERS, C.; FAIVRE-RAMPANT, O.; CRÉVECOEUR, M.; PENEL, C.; GREPPIN, H.; DOMMES, J. Changing concepts in plant hormone action. **In Vitro Cellular Development of Biology of Plant**, v. 39, p. 85–105, . 2003.

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. v.1, p 183-242.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Culturas de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CBAB, 1999. v..2. p.533-568.

GUIDERDONI, E.; MÉROT, B.; EKSOMTRAMAGE, T.; PAULET, F.; FELDMANN, P.; GLASZMANN, J.C. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum species*). In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.), Somatic embryogenesis and synthetic seed I. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, v. 31, p. 92–113, 1995.

GUZZO, F.; BALDAN, B.; MARIANI, P.; LO SCHIAVO, F.; TERZI, M. Studies on the origin of totipotent cells in explants of *Daucus carota* L. **Journal of Experimental Botany**, v.45, p,1427–1432, 1994.

HUTCHINSON M.J.; KRISHNARAJ S.; SAXENA P.K. Inhibitory effect of GA3 on the development of thidiazuron induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium hortorum* Bailey) hypocotyl cultures. **Plant Cell Reports**, v.16, p.435–438,1997.

IVANOVA, A.; VELCHEVA, M.; DENCHEV, P.; ATANASSOV, A.; Van

ONCKELEN, H.A. Endogenous hormone levels during direct somatic embryogenesis in *Medicago falcata*. **Physiology of Plant**, v.92 p. 85–89, 1994.

JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation*, v. 47, n.2-3, p. 91-110, 2005.

JIMÉNEZ, V.M.. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, p. 196–223, 2001.

JIMÉNEZ, V.M.; BANGERTH, F. Relationship between endogenous hormone levels in grapevine callus cultures and their morphogenetic behaviour. **Vitis**, v.39, p. 151–157. 2000.

JIMÉNEZ, V.M.; BANGERTH, F.. Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot. **Physiologia Plantarum**, v.111, p.389–395, 2001a.

JIMÉNEZ, V.M.; BANGERTH, F. Endogenous hormone levels in initial explants in embryogenic and nonembryogenic callus cultures of competent and non-competent wheat genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.67, p.37–46, 2001b.

JIMÉNEZ, V.M.; BANGERTH, F. Hormonal status of maize initial explants and of the embryogenic and nonembryogenic callus cultures derived from them as related to morphogenesis *in vitro*. **Plant Science**, v.160, p.247–257, 2001c.

JIMÉNEZ, V.M.; GUEVARA, E.; HERRERA, J.; BANGERTH, F. Evolution of endogenous hormone concentration in embryogenic cultures of carrot during early expression of somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v.23, n.567–572, 2005.

KIYOSUE, T.; SATOH, S.; KAMADA, H.; HARADA, H. Somatic

embryogenesis in higher plants. **Journal of Plant Research**. v.3, p. 75–82, 1993.

KUMAR, S.; DHINGRA, A.; DANIELL, H. Stable transformation of the cotton plastid genome and maternal inheritance of transgenes. **Plant Molecular Biology**, v.56, p.203–216, 2004.

KUMRIA, R.; SUNNICHAN, V.G.; DAS, S.K.; GUPTA, V.S.; BHATNAGAR, R.K.; LEELEAVATHI, S. High-frequency somatic embryo production and maturation into normal plants in cotton (*Gossypium hirsutum*) through metabolic stress. **Plant Cell Report**. v.21, p.635-639, 2003.

LAMB, C.R.C.; MILACH, S.C.K.; PASQUALI, G.; BARRO, R.S. Embrionese somática e regeneração de plantas a partir de embrião maduro de aveia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n,2, p.123-130, fev. 2002.

LEELAVATHI, S.; SUNNICHAN, V.G.; KUMRIA, R.; VIJAYKANTH, G.P.; BHATNAGAR, R.K.; REDDY, V.S. A simple and rapid Agrobacterium-mediated transformation protocol for cotton (*Gossypium hirsutum* L.): Embryogenic calli as a source to generate large numbers of transgenic plants. **Plant Cell Report**, v.22, p.465–470, 2004.

LI, Z.; TRAORE, A; MAXIMOVA, S.; GUILTINAN, M. J. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cação (*Theobroma cacao* L.) using thiadiazuron. **In vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Largo, MD, v. 34, p.293-299, 1998.

LIU C.M., XU Z.H.; CHUA N.H. Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. **Plant Cell**, v.5, p.621–630, 1993.

LEDO, A. da S.; LAMEIRA, O. A.; MENEZES, I. C. de. **Embrionese somática e regeneração de plantas em açaizeiro**. Rio Branco: Embrapa Acre, 2002. 22 p. (Embrapa Acre. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 34).

LEELAVATHI, S.; SUNNICHAN, V. G.; KUMRIA, R.; VIJAYKANTH, G. P.; BHATNAGAR, R. K.; REDDY, V. S. A simple and rapid Agrobacterium-mediated transformation protocol for cotton (*Gossypium hirsutum* L.): Embryogenic calli as a source to generate large numbers of transgenic plants. **Plant Cell Report**, v.22, p.465–470, 2004.

MACHADO, T. F. **Regeneração *in vitro* e transformação genética de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) do Nordeste brasileiro.** Fortaleza: Universidade Federal do Ceara, 2004.

MANTELL, S.H.; MATTHEWS, J.A.; MCKEE, R.A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas.** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. 333p.

MCKERSIE B.D.; BROWN D.C.W. Somatic embryogenesis and artificial seeds in forage legumes. **Seed Science Research**, v.6, p.9–126, 1996.

MHASKE V.B., CHENGALRAYAN K.; HAZRA S. Influence of osmotica and abscisic acid on triglyceride accumulation in peanut somatic embryos. **Plant Cell Report**, v.17, p.742–746. 1998.

MISHRA, R.; WANG, H.Y.; YADAV, N.R.; WILKINS, T.A.S. Development of a highly regenerable elite Acala cotton (*Gossypium hirsutum* cv. Maxxa) – a step towards genotype-independent. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.73, n.1, p.21-35, 2003

MORAES, J.N. **Análise comparativa da embriogênese somática em *Citrus sinensis*, var. valência, e *Citrus limonia*, var. limão cravo.** Piracicaba, São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2003.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A. Rivesed medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-479, 1962.

MURTHY, B.N.S.; MURCH, S.J.; SAXENA, P.K. Thidiazuroninduced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*):

endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons.

**Physiologia Plantarum**, v.94, p.268–276, 1995.

NISHIWAKI, M.; FUJINO, K.; KODA Y.; MASUDA, K.; KIKUTA, Y.

Somatic embryogenesis induced by the simple application of abscisic acid to carrot (*Daucus carota* L.) seedlings in culture. **Planta**, v. 211, p.756–759. 2000.

PANAIA, M.; SENARATNA, T.; DIXON, K.W.; SIVASITHAMPARAM, K.

The role of cytokinins and thidiazuron in the stimulation of somatic embryogenesis in key members of the Restionaceae. **Australian Journal Botany**, v.52, n.257–267, 2004.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A; RAMOS, J.D. **Cultura de tecidos:**

tecnologia e aplicações. Lavras: Ed. Brasil, 1997.

PINTOS B.; MARTN J.P.; CENTENO M.L.; VILLALOBOS N.; GUERRA H.;

MARTN L. Endogenous cytokinin levels in embryogenic and non-embryogenic calli of *Medicago arborea* L. **Pant Science**, v.163, n.5, p. 955-960, 2002.

PULLMAN, G.S.; GUPTA, P.K.; TIMMIS, R.; CARPENTER, C.;

KREITINGER, M.; WELTY, E. Improved Norway spruce somatic embryo development through the use of abscisic acid combined with activated carbon. **Plant Cell Report**, v.24, p.271–279, 2005.

RAJASEKARAN, K.; HEIN, M.B.; DAVIS, G.C.; CARNES, M.G.; VASIL I.K..

Endogenous growth regulators in leaves and tissue cultures of *Pennisetum purpureum* Schum. **Journal of Plant Physiology**, v.130, p12–25, 1987a.

RAJASEKARAN, K.; SAKHANOKHO H.F.; ZIPF, A.; SUKUMAR, S.;

SHARMA, G.C.; CHEE, P.W. Somatic embryo initiation and germination in diploid cotton (*Gossypium arboreum* L.). **In Vitro Cellular and Development Biology: Plant**, v.40, n.2, p.177-181, 1987b.

RAKITIN, V.Y.; DOLGIKH, Y.I; SHAIKINA, E.Y.; KUZNETSOV, V.V.



Oligosaccharide inhibits ethylene synthesis and stimulates somatic embryogenesis in a cotton cell culture. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 48, n.5, 10, p. 628-632, 2001.

RAO, A.Q.; HUSSAIN, S.S.; SHAHZAD, M.S.; BOKHARI, S.Y.A.; RAZA, M.H., RAKHA, A.; MAJEED, A.; SHAHID, A.A.; SALEEM, Z.; HUSNAIN, T.; RIAZUDDIN S. Somatic embryogenesis in wild relatives of cotton (*Gossypium* Spp.). **Journal Zhejiang University**, v.7, n.4, p.291-298, 2006.

SAKHANOKHO, H.F, AKINS, P.O, MAY, O.L, CHEE, P.W. Putrescine enhances somatic embryogenesis and plant regeneration in upland cotton. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, v.81, n.1, p.91-95, 2005.

SASAKI, K.; SHIMOMURA, K.; KAMADA, H.; HARADA, H. IAA metabolism in embryogenic and non-embryogenic carrot cells. **Plant Cell Physiology**. v. 35: 1159–1164, 1994.

SCHIAVONE, F.M.; COOKE, T.J.. Unusual patterns of somatic embryogenesis in the domesticated carrot: developmental effects of exogenous auxins and auxin transport inhibitors. **Cell Death and Differentiation**. v.21, p. 53–62, 1987.

SILVEIRA, E.D. **Análise da expressão gênica em ovários de *Brachiaria brizantha* apomítica e sexual e otimização da transformação por biobalística**. 2004. 101 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2004.

STEWART, F.C., MAPES, M.O., MEARS, K. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures from freely suspended cells. **American Journal of Botany**, v.45, p.705-708, 1958.

SUN, Y.; ZHANG, X.; NIE, Y; GUO, X; JIN, S.; LIANG, S. Production and characterization of somatic hybrids between upland cotton (*Gossypium hirsutum*) and wild cotton (*G. klotzschianum* Anderss) via electrofusion. **Theoretical and Applied Genetics**, v.109, p.472–479, 2004.

SUN, Y.; ZHANG, X.; HUANG, C.; NIE, Y.; GUO, X. Factors influencing *in vitro* regeneration from protoplasts of wild cotton (*G. klotzschianum* A) and RAPD analysis of regenerated plantlets. *Plant Growth Regulation*, v.46, n.1, p. 79-86, 2005.

TAKENO, K.; KOSHIOKA, M.; PHARIS, R.P.; RAJASEKARAN, K.; MULLINS M.G.. Endogenous gibberellin-like substances in somatic embryos of grape (*Vitis vinifera* x *Vitis rupestris*) in relation to embryogenesis and the chilling requirement for subsequent development of mature embryos. *Plant Physiology*, v.73, p.803–808, 1983.

THOMAS T.L. Gene expression during plant embryogenesis and germination: an overview. *Plant Cell*, v.5, p.1401–1410, 1993.

TISSERAT, B.; ESAN, E.B.; MURASSHIJGE, T. Somatic embryogenesis in angiosperms. *Horticultural Reviews*, v.1, p.1-78, 1979.

TOKUJI, Y.; KURIYAMA, K. Involvement of gibberellin and cytokinin in the formation of embryogenic cell clumps in carrot (*Daucus carota*). *Journal of Plant Physiology*, v.160, p.133–141, 2003.

TOONEN, M.A.J.; VRIES, S.C.de. Initiation of somatic embryos from single cells. In: WANG, T.L.; CUMING A. (Eds), **Embryogenesis: the generation of a plant**. Oxford: Bios Scientific, 1996. p. 173–189.

TULI, R.; KUMAR, M. Plant regeneration in cotton: a short-term inositol starvation promotes developmental synchrony in somatic embryogenesis. *In Vitro Cellular and Development Biology: Plant*, v.40, n.3, p.294-298, 2004.

WILLADINO, L.; CÂMARA, T. **Cultura de tecidos vegetais**. Disponível em: <http://www.ufrpe.br/quimica/culttec.htm>. Acesso em: 10 out. 2005.

ZANOL, G.C.; OLIVEIRA, R.P. de; MORAES, J.N.; ALMEIDA, E.P. de. Embriogênese somática e regeneração de plantas a partir de embriões zigóticos de mamoeiro 'Sunrise Solo'. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v.22, n.1, p.72-76, 2000.

ZENG, F.; , ZHANG, X. ; ZHU, L.; TU, L.; GUO, X.; NIE, Y. Isolation and characterization of genes associated to cotton somatic embryogenesis by suppression subtractive hybridization and macroarray. **Plant Molecular Biology**, v.60, p.167–183, 2006.

ZHANG, B.H.; LIU, F.;LIU, Z.H.; WANG, H.M; YAO, C.B. Effects of kanamycin on tissue culture and somatic embryogenesis in cotton. **Plant Growth Regulation**, v.33, n.2, p.137-149, 2001.

ZHANG, B.H.; LIU, F.;YAO, C.B. Plant regeneration via somatic embryogenesis in cotton. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.60, p.89-91, 2000.

ZHANG, C.G.; LI, W.; MAO, Y.F.; ZHAO, D.L.; DONG, W.; GUO, G.Q. Endogenous hormonal levels in *Scutellaria baicalensis* calli induced by thidiazuron. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.52, p.345–351, 2005.

**Embrapa**

---

**Algodão**

**Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento**

