

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Documentos

ISSN 0103 - 0205
Setembro, 2008 **194**

**Técnicas de Cultivo *In Vitro* Aplicadas
na Mamoneira**



Embrapa



ISSN 0103-0205
Setembro, 2008

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Algodão

Documentos 194

Técnicas de Cultivo *In Vitro* Aplicadas na Mamoneira

Julita Maria Frota Chagas Carvalho
Silvany de Sousa Araújo

Campina Grande, PB.
2008

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Algodão

Rua Osvaldo Cruz, 1143 – Centenário
Caixa Postal 174
CEP 58.428-095 - Campina Grande, PB
Telefone: (83) 3182-4300
Fax: (83) 3182-4367
sac@cnpa.embrapa.br
<http://www.cnpa.embrapa.br>

Comitê de Publicações

Presidente: Carlos Alberto Domingues da Silva

Secretário: Valter Freire de Castro

Membros: Fábio Aquino de Albuquerque

Giovani Greigh de Brito

João Luiz da Silva Filho

Máira Milani

Maria da Conceição Santana Carvalho

Nair Helena Castro Arriel

Valdinei Sofiatti

Wirton Macedo Coutinho

Supervisor Editorial: Valter Freire de Castro

Revisão de Texto: Maria José da Silva e Luz

Tratamento das Ilustrações: Geraldo Fernandes de Sousa Filho

Capa: Flávio Tôrres de Moura/Sérgio Cobel da Silva

Editoração Eletrônica: Geraldo Fernandes de Sousa Filho

1ª Edição

1ª impressão (2008) 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)

Técnicas de Cultivo *In Vitro* Aplicadas na Mamoneira, por Julita Maria Frota Chagas Carvalho e Silvano de Sousa Araújo. Campina Grande, 2008.

23p. (Embrapa Algodão. Documentos, 194)

1. Planta. 2. Tecido vegetal. 3. Propagação *In Vitro*. I. Carvalho, J.M.F.C. II. Araújo, S. de S. III. Título. IV. Série.

CDD: 571.62

© Embrapa 2008

Autores

Julita Maria Frota Chagas Carvalho

Ph.D. Eng. Agrôn. da Embrapa Algodão,
Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário,
CEP 58.428-095, Campina Grande, PB.
E-mail: julita@cnpa.embrapa.br

Silvany de Sousa Araújo

Estudante da Universidade Estadual da Paraíba, Estagiária da Embrapa
Algodão
E-mail: ny_araujo@hotmail.com

Apresentação

O cultivo de tecidos é de importância fundamental na aceleração dos programas de melhoramento genético vegetais da Embrapa algodão.

A aplicação das técnicas de cultura de tecidos na mamoneira torna-se indispensável, tendo em vista a importância da cultura da mamona para o Nordeste brasileiro e diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas, visando aprimorar os conhecimentos das técnicas de cultivo de tecido in vitro aplicadas a mamoneira, que constituirá sem dúvida, uma importante ferramenta para o melhoramento vegetal, visto que possibilita a obtenção de clones com caracteres agrônômicos desejáveis.

Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão
Chefe Geral da Embrapa Algodão

Sumário

Técnicas de Cultivo <i>In Vitro</i> Aplicadas na Mamoneira	11
1. Introdução	11
2. Aplicações do Cultivo de Tecidos	12
2.1. Cultivo <i>In Vitro</i> de anteras	12
2.2. Crioconservação de sementes	13
2.3. Propagação <i>In Vitro</i> da mamoneira	14
2.4. Cultivo de embriões zigóticos ou embriões imaturos	15
3. Fatores que podem influenciar no cultivo <i>In Vitro</i>	17
3.1. Seleção do explante	17
3.2. Desinfecção do explante	17
3.3. Contaminação dos explantes	17
3.4. Meios de cultivos	18
3.5. Uso de Fitorreguladores	18
4. Conclusões	19
5. Referências Bibliográficas	19

Técnicas de Cultivo *In Vitro* Aplicadas na Mamoneira

Julita Maria Frota Chagas Carvalho
Silvany de Sousa Araújo

1. Introdução

O cultivo de tecidos pode ser definido como um conjunto de técnicas que permitem a cultura de órgãos, tecidos, células e protoplastos em condições assépticas, empregando meios nutritivos artificiais. Essas técnicas podem ser aplicadas para a obtenção de plantas livres de patógenos, propagação massiva de plantas, conservação de germoplasma, melhora por mutagênese *in vitro* e engenharia genética (PIZA; PINHO, 2002).

As técnicas de cultura de tecidos têm sido empregadas de diferentes formas no desenvolvimento de cultivares superiores de plantas, podendo oferecer novas alternativas aos programas de melhoramento em suas diferentes fases e, muitas vezes, oferecem soluções únicas (FERREIRA, et al., 1998).

A mamoneira (*Ricinus communis* L.), planta de alto valor econômico, tem nas sementes, como produtos finais processados, o óleo e a torta. O primeiro, é utilizado na medicina, na fabricação de filtros hospitalares de hemodiálise, de prótese óssea de resina, de silicões especiais e como matéria-prima para produção de tintas especiais, sabão, vernizes, nylon e cosméticos, entre cerca de, aproximadamente, 650 produtos, que apresentam a vantagem de serem biodegradáveis e de biomassa renovável. A torta é bastante usada como fertilizante, podendo ser utilizada para ração de bovinos, desde que passe por um processo de desintoxicação (GONÇALVES et al., 2005).

Segundo Chierice e Claro Neto (2001), a partir do óleo da mamona pode-se

obter também o diesel vegetal, que substitui o óleo diesel derivado do petróleo utilizado como combustível. Para o Brasil, o óleo da mamona pode ser considerado uma matéria-prima estratégica, pois, além de seu potencial químico e energético, os lubrificantes e fluidos aeronáuticos já são todos sintetizados a partir de suas moléculas.

Tendo em vista a importância da cultura da mamona para o Nordeste brasileiro, diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas, visando aprimorar os conhecimentos das técnicas de cultivo de tecido *in vitro* aplicadas a mamoneira, que constituirá sem dúvida uma importante ferramenta para o melhoramento vegetal, visto que possibilita a obtenção de clones com caracteres agrônômicos desejáveis.

2. Aplicações do Cultivo de Tecidos

Diversas técnicas do cultivo de tecidos *in vitro* vêm sendo aplicadas à cultura da mamoneira, sendo estas, de grande importância para o melhoramento da espécie e o desenvolvimento de novas cultivares.

2.1. Cultivo *In Vitro* de anteras

Entre as técnicas de cultivo *in vitro*, a cultura de anteras apresenta-se como uma ferramenta de grande utilidade em programas de melhoramento, principalmente por reduzir o tempo necessário para a obtenção de linhagens homozigóticas, substituindo as inúmeras gerações de autofecundação necessárias no processo convencional e permitindo o estudo de mutações recessivas, visto que indivíduos haplóides e duplo-haplóides, por se constituírem de apenas um complemento cromossômico, não apresentam problemas de dominância e recessividade (BAJAJ, 1984; FERNANDES, 1987).

Segundo Peters et al. (1998), as plantas haplóides podem ser obtidas de duas maneiras: por androgênese direta ou por androgênese indireta. Na androgênese direta, o micrósporo comporta-se como um zigoto e passa por vários estádios de embriogênese, semelhante ao que ocorre *in vivo*. Os embriões, principalmente no estágio globular, são liberados, os cotilédones desenvolvem-se e as plantas emergem das anteras de 4 a 8 semanas. Na androgênese indireta, os micrósporos, em vez de passarem pela embriogênese, dividem-se algumas vezes,

formando calos, os quais emergem através da parede da antera. Normalmente a regeneração de plantas via calo se dá com maior frequência.

A maior dificuldade do uso da cultura de antera nas espécies, consiste na adequação do meio de cultura apropriado. Para que ocorra a divisão celular, o processo de ativação e desativação dos genes, no momento e local apropriado é necessário ajustes na concentração e tipo de reguladores de crescimento, uso de vitaminas e carvão ativado (INGRAM et al., 2000; SALOMOM, 2003; TEIXEIRA; TORRES, 1998).

Souza et al. (2002) constatou a eficiência do 2,4D na indução de calos in vitro, a partir de anteras de mamona. Vargas (2006) também observou que os grãos de pólen de mamona apresentaram alto percentual de viabilidade polínica na antese. O maior percentual de grãos de polens viáveis obtido é das cultivares IAC-80 e Cafelista; no entanto, mesmo apresentando diferenças significativas das cultivares AL-Guarany 2002 e AL-Preta, são igualmente consideradas com bom potencial de viabilidade. Sendo, portanto, possível a utilização de todas as cultivares analisadas na indução de fertilização em programas de melhoramento.

2.2. Crioconservação de sementes

A crioconservação em nitrogênio líquido é um método potencialmente estudado para reduzir a taxa de deterioração, aumentando assim o tempo de armazenamento das sementes, assegurando a preservação das fontes genéticas da planta, além de reduzir os custos e evitar a perda da viabilidade (STANWOOD; BASS, 1981; STANWOOD, 1995).

Medeiros e Cavallar (1992) definem crioconservação em nitrogênio líquido como sendo a preservação de materiais biológicos a baixas temperaturas (entre -160 e -196°C), nas quais todos os processos metabólicos são essencialmente paralisados e mantidos em estado latente, proporcionando a preservação dos materiais a longo prazo. Os outros métodos de conservação somente adiam a deterioração por um período de tempo determinado e específico, de acordo com o material e a espécie em questão.

Outras vantagens da crioconservação estão relacionadas com: 1) o pequeno espaço a ser ocupado por um banco de germoplasma mantido em nitrogênio líquido; 2) a simplicidade da manutenção, bastando manter-se o nível de

nitrogênio líquido nos botijões, reabastecendo-o a cada 40-60 dias e 3) o baixo custo do armazenamento, uma vez que não exige sistema de refrigeração nem de eletricidade (ALMEIDA et al., 2002).

Lopes et al. (2006), obtiveram a crioconservação de eixos embrionários de mamona com teor de água limite entre 4 a 7% b.u.(baixa umidade).

Almeida et al. (2002) verificou que os melhores resultados de qualidade fisiológica das variedades de mamona Nordestina e Pernambucana foram obtidos aos 30 dias de crioconservação, tanto no vapor (-176 °C) como na imersão (-196 °C) em nitrogênio líquido. Além disso, as sementes das variedades de *R. communis* estudadas, podem ser crioarmazenadas com a umidade de colheita em torno de 6% b.u.

2.3. Propagação *In Vitro* da mamoneira

A propagação vegetativa utilizando técnicas de cultura de tecido pode ser um valioso instrumento na propagação clonal rápida de mudas em larga escala. Este método vem sendo extensamente utilizado para a propagação clonal e eliminação de vírus em grande número de espécies, além da introdução de novas variedades, previsão de novos genótipos, formação de bancos de germoplasma, previsão de estoque de plantas sadias e atendimento à outras áreas da pesquisa (HARTMANN; KESTER, 1983).

A aplicação da micropropagação destaca-se pela hibridização e desenvolvimento de novas cultivares, na recuperação de substâncias farmacêuticas, na multiplicação segura de cultivares desejáveis, na propagação rápida com alto coeficiente de multiplicação, e como auxiliar na salvaguarda do patrimônio genético de plantas ameaçadas pela exploração humana (SIMÕES, 1988).

Para o sucesso de métodos de micropropagação *in vitro* é necessária: a seleção dos explantes adequados, estabelecendo-se condições de desinfecção e cultura; o estabelecimento de condições físicas e fisiológicas de desenvolvimento dos explantes e o enraizamento das partes aéreas formadas após subcultivos sucessivos formando a planta completa (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990).

Carvalho et al. (2005), utilizaram o meio MS (Murashige Skoog) para a regeneração do explante eixo embrionário de sementes de mamona e observou

que é possível propagar sementes de mamona a partir do explante eixo embrionário, concluíram também que aclimatação das plântulas regeneradas é viável. Aires (2007), constatou que o complexo vitamínico contendo sais do meio MS acrescidos de vitaminas do meio B5 (GAMBORG et al., 1968), adicionado de sacarose apresentou um efeito diferencial e promissor no superbrotaamento in vitro em explantes de gema apical do genótipo de mamona BRS Nordestina. Araújo et al. (2008), conseguiram o superbrotaamento da cultivar BRS Paraguaçu, utilizando o meio MS básico, suplementado com a combinação dos reguladores TDZ + GA3, com 45% de glicose

2.4. Cultivo de embriões zigóticos ou embriões imaturos

Segundo Carvalho e Vidal (2003), o cultivo de embriões zigóticos ou embriões imaturos é usado para o co-cultivo de híbridos entre diferentes espécies, tornando possível, a certas cultivares, a transferência de genes desejáveis.

A técnica de cultura de embriões tem se expandido e ensejado importantes contribuições em estudos básicos da fisiologia do desenvolvimento do embrião, em programas de melhoramento genético, para recuperação de híbridos de interesse de cruzamentos incompatíveis, bem como para a quebra de dormência de sementes, observada em algumas espécies (FERREIRA et al., 1990). Deccetti (2000) afirma que, através do cultivo in vitro de sementes ou embriões, condições ambientais fundamentais, como disponibilidade de água, temperatura adequada, luminosidade e composição atmosférica são apropriadas para que o processo de germinação ocorra; além disso, a presença de reguladores de crescimento e de fontes exógenas de carboidratos, no meio de cultura, possibilita contornar fatores que inibem a germinação de diversas sementes, como a presença de inibidores químicos, imaturidade de embriões e pobre acúmulo de reservas nutritivas, aumentando, assim, a percentagem de germinação ou fazendo com que o processo seja mais efetivo, rápido e uniforme.

Carvalho et al. (2006a), conseguiram regenerar 88 acessos do banco ativo de germoplasma de mamona da Embrapa Algodão, por meio do cultivo in vitro de embriões zigóticos de sementes de mamona (Figura 1) Carvalho et al. (2005) também regeneraram eixos embrionários que apresentavam até dois por cento de germinação no campo (Figura 2).



Fig. 1. Regeneração in vitro de embriões zigóticos de sementes de mamona



Fig. 2. Cultivo in vitro de embriões imaturos a partir de sementes secas de mamona.

3. Fatores que podem influenciar no cultivo *In Vitro*

Diversos fatores podem influenciar o êxito da cultura de tecidos in vitro, entre os quais destacam-se:

3.1. Seleção do explante:

O sucesso no estabelecimento da cultura de células, órgãos ou tecidos in vitro depende, em geral, da seleção do explante (CARVALHO, 2001). Cada espécie ou variedade se comporta de maneira diferente em função da idade da planta e suas condições prévias no campo, a época da coleta, o tipo de explante, a posição que este ocupa na planta e uma larga lista de aspectos próprios do material vegetal, que dificilmente podem ser controlados em sua totalidade. Além disso, o material cultivado in vitro tem que estar livre de microrganismos que possam interferir no processo (PIEREK, 1988).

3.2. Desinfecção do explante

O processo de desinfecção começa com os pré-tratamentos aplicados à planta matriz, principalmente para combater microorganismos, é uma etapa essencial, na qual podem ser utilizadas diversas substâncias com ação germicida. Entre os mais utilizados estão o etanol, o hipoclorito de sódio e o de cálcio, cloreto de mercúrio, ácido clorídrico, peróxido de hidrogênio, entre outros. Além desses, os habituais detergentes de cozinha, bem como o Tween 20, podem ser misturados à solução desinfestante para facilitar o contato dos agentes esterilizantes com o tecido, reduzindo a tensão superficial (WILLADINO; CÂMARA, 2007).

3.3. Contaminação dos explantes

Um dos maiores problemas que influenciam na cultura de tecidos diz respeito à contaminação bacteriana e fúngica; além dessas contaminações superficiais, são freqüentes em explantes derivados de plantas cultivadas no campo contaminações presentes no interior dos tecidos, conhecidas como contaminações endógenas, (CARVALHO et al., 2006b).

A assepsia do material vegetal é de fundamental importância na micropropagação e, sendo efetuada com sucesso, evitará contaminação no meio de cultura por

fungos e bactérias, que ocasionam perdas do material vegetativo e do meio de cultura (RODRIGUES et al., 2003). Segundo Scalize (2003), é necessário enorme cautela em relação à assepsia, desde o corte do material a campo até o manuseio na câmara de fluxo laminar.

3.4. Meios de cultivos

Além de servir como suporte para o explante, o meio de cultivo também deve suprir tecidos e órgãos cultivados in vitro com nutrientes necessários ao crescimento. Basicamente, o meio de cultivo fornece macro e micronutrientes e carboidrato (normalmente sacarose) para substituir o carbono que, em geral, a planta fixa da atmosfera pela fotossíntese. Para acelerar o crescimento, é comum incluir componentes orgânicos como vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento (CARVALHO, 2001). Há inúmeras formulações dos meios de cultura, não existindo um meio padrão, embora o mais amplamente difundido seja o meio idealizado por Murashige e Skoog, conhecido mundialmente como meio MS.

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 sobre pontes de papel, evitando que fiquem submersos (WILLADINO; CÂMARA, 2007).

3.5. Uso de Fitorreguladores

Os fitorreguladores são de fundamental importância para a multiplicação in vitro de várias espécies. Sua adição em meios nutritivos tem como objetivo principal suprir possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta matriz; além de estimular respostas como alongamento ou multiplicação da parte aérea (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Os fitohormônios são classificados em cinco grupos: auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e inibidores. Os reguladores de crescimento mais utilizados são auxinas, citocininas e giberelinas. A escolha do fitorregulador a ser utilizado na cultura in vitro dependerá: do tipo de morfogênese desejada; do seu nível

endógeno no explante no momento da excisão; da capacidade do tecido sintetizar o regulador durante o período do cultivo e da possível interação entre os fitohormônios endógenos e aqueles adicionados ao meio (SANTOS, 2003).

4. Conclusões

A aplicação das técnicas de cultura de tecidos in vitro na mamoneira torna-se indispensável, sendo utilizadas em uma ou outra etapa do melhoramento, oferecendo assim, novas alternativas aos programas de melhoramento em suas diferentes fases e, muitas vezes, oferecem soluções únicas.

Alguns fatores podem influenciar no cultivo in vitro da mamoneira, como o tipo de explante utilizado, as técnicas de desinfestação dos explantes, a ocorrência de contaminação destes, os meios de cultivos utilizados e os fitorreguladores adicionados a estes meios.

5. Referências Bibliográficas

AIRES, P. S. R.; CARVALHO, J. M. F. C.; PIMENTEL, N. W.; SILVA, H. Efeito da concentração de vitaminas e das fontes de carbono no superbrotamento da mamona utilizando o genótipo BRS Nordestina. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. v. 7, n. 2, 2007.

ALMEIDA, F. de A. C.; MORAIS, A. M. de; CARVALHO, J. M. F. C.; GOUVEIA, J.P.G. de. Crioconservação de sementes de mamona das variedades nordestina e pernambucana. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v. 6, n. 2, p. 295-302, 2002.

ARAÚJO, S. S.; CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. de A.; MEDEIROS, M. J. L. e; MILANI, M. Indução do superbrotamento da mamona BRS-Paraguaçu através do cultivo in vitro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 3., 2008, Salvador. **Energia e Ricinoquímica**: anais. Campina Grande: Embrapa Algodão; Salvador: Governo da Bahia: Secretaria da Agricultura: Secretaria de Ciência, Tecnologia e Inovação: Secretaria da Indústria, Comércio e Mineração: Secretaria do Meio ambiente, 2008. 1 CD-ROM.

BAJAJ, Y. P. S. In vitro production of haploids. In: EVANS, D. A.; SHARP, W.

- R.; AMMIRATO, P. U.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding**. New York: McMillan, 1984. v. 1, cap. 6, p. 229.
- CARVALHO, J. M. F. C. **Manual do laboratório de cultivo de tecido**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2001. 33 p. (Embrapa Algodão. Circular Técnica, 46).
- CARVALHO, J. M. F. C.; ARAÚJO, S. S.; SILVA, M. M. de A.; MEDEIROS, M. J. L. e; MILANI, M. **Regeneração in vitro do banco ativo de germoplasma da mamona (*Ricinus communis* L.)**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006a. 4 p. (Embrapa Algodão. Comunicado Técnico, 283).
- CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. de A.; MEDEIROS, M. J. L. e. **Fatores inerentes à micropropagação**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006b. 30 p. (Embrapa Algodão. Documentos, 148).
- CARVALHO, J. M. F. C.; RIBEIRO, C. S. N.; SILVA, H.; SANTOS, J. W. dos. **Propagação in vitro e aclimação a partir de sementes inviáveis armazenadas no banco ativo de germoplasma de mamona**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005. 12 p. (Embrapa Algodão. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 64).
- CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. **Noções de cultivo de tecidos vegetais**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003. 40 p. (Embrapa Algodão. Documentos, 116).
- CHIERICE, G. O.; CLARO NETO, S. Aplicação industrial do óleo. In: AZEVEDO, D. M. P. e LIMA, E. F (Ed.). **O Agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2001.
- DECCETTI, S. F. C. **Propagação in vitro**. 2000. 101 p Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- FERNANDES, M. I. B. de M. Perspectivas da biotecnologia para o melhoramento de plantas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 881-896, 1987.
- FERREIRA, M. E.; 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. p. 21- 44.

FERREIRA, A. G.; HU, C. Y.; SANTAREM, E. R. Somatic embryogenesis of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill), Brazilian cultivars ivorá and IAS-5. **Phyton**, v. 51, p. 139-144, 1990.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Exp cell Res.** v. 50, p. 151-158, 1968.

GONÇALVES, N. P.; FARIAS, M. A. P. V. R.; SATURNINO, H. M.; PACHECO, D. D. Cultura da Mamoneira. In: PRODUÇÃO de oleaginosas para biodiesel, **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, p. 28-32, 2005.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, DF: ABCPT/EMBRAPA-CNPH, 1990. p. 99-169.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPH. 1998. v.1, p. 183-242.

HARTMANN, H. T., KESTER, D. E. **Plant propagation: principles and practices**. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1983. 727 p.

INGRAM, H. M.; POWER, J. B.; LOWE, K. C.; DAVEY, M. R. Microspore-derived embryo induction from cultured anthers of wheat, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 60, p. 235-238, 2000.

LOPES, K. P.; ALMEIDA, F. de A. C.; CARVALHO, J. M. F. C.; BRUNO, R. de L. A. Protocolo para crioconservação de mamona (*Ricinus communis* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 2004, Campina Grande. **Energia e Sustentabilidade: anais**. Campina Grande:Embrapa Algodão, 2006. 1 CD-ROM.

MEDEIROS, A. C. S.; CAVALLAR, D. A. N. Conservação de germoplasma de aroeira (*Astronium urundeuva* (Fr. All.) Engl). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 14, n. 1, p. 713-715, 1992.

PETERS, J. A.; BOBROWSKI, V. L.; ROSINHA, G. M. S. Produção de haplóides e duplo haplóides. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSCO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. [S.l.: s.n.], 1998. v. 2, p. 569-612.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Mundiprensa, 1988.

PIZA, I. M. de T. PINHO, R. S. Protocolo de micropropagação da mandioca. In: CAGNON, J. R.; CEREDA, M. P.; PANTAROTTO, S. In CULTURA de tuberosas amiláceas latino-americanas. Campinas: Fundação Cargill, 2002. (Série cultura de tuberosas amiláceas latino-americanas, 2).

RODRIGUES, T. M.; PAIVA, P. D. de O.; PAIVA, R.; PASQUAL, M. Assepsia de sementes de bromélia imperial para cultivo in vitro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: ABCTP, p. 251.

SALOMOM, M. V. **Trigo: avaliação de linhagens diplóides obtidas via cultura de anteras**. 2003. 108 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo, Piracicaba.

SANTOS, E. K. dos. Totipotência celular e cultura de tecidos vegetais. In: FREITAS, L. B.; BERED, F. **Genética e evolução vegetal**. Porto Alegre: UFRGS, 2003. p. 415-444.

SCALIZE, F. E. **Indução e detecção de azadirachtina em calos de *Azadirachta indica* Adr. Juss.(Nim)**. 2003. 24 f. Tese (Mestrado em agronomia) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal.

SIMÕES, M. O. M. **Ontogênese de gemas e raízes adventícias de *Citrus sinensis* (Linn.) Osbeck cv *Pêra cultivadas in vitro***. 1988. 56 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SOUZA M. M.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* degener). **Ciênc. Agrotec.**, Lavras. v. 26, n. 6, p. 1209-1217, nov./dez., 2002.

STANWOOD, P. C.; BASS, L. N. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 9, p. 423-437, 1981.

STANWOOD, P. C.; SOWA, S. Evaluation of onion (*Allium cepa* L.) seed after

10 years of storage at 5, -18 and -196°C. **Crop Science**, Madison, v. 35, p.852-856, 1995.

TEIXEIRA, S. L.; TORRES, A. C. Organização de laboratório de cultura de tecidos de plantas. In: CULTURA de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa, 1998. 864 p.

VARGAS, D. P.; BOBROWSKI, V. L.; SILVA, S. D. dos A. e. Cultivo in vitro de anteras de mamona: resultados preliminares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 2., 2006, Aracaju. **Cenário atual e perspectivas**: anais. Campina Grande: Embrapa Algodão; Embrapa Tabuleiros Costeiros; SAGRI, 2006. 1 CD-ROM.

WILLADINO, L.; CÂMARA, T. **Cultura de tecidos vegetais**. Disponível em: <<http://www.ufrpe.br/quimica/culttec.htm>> . Acesso em: 21 dez. 2007.

Embrapa

Algodão

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

