

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA *IN VITRO* EM COUVE-COMUM¹

VIRGÍNIA MARIA TENÓRIO SABINO DONATO², ARNÓBIO GONÇALVES DE ANDRADE³,
JOSÉ BARBOSA CABRAL⁴ e GILBERTO DIAS ALVES⁵

RESUMO - O objetivo deste estudo foi obter calos e embriões somáticos de couve-comum (*Brassica oleracea* L., var. *leucocephala*) e caracterizá-los por meio de observações histológicas. Foram cultivadas, *in vitro*, explantes foliares, sob condições assépticas, em meio nutritivo MS, suplementado com várias combinações entre 2,4-D/BAP e 2,4-D/KIN. Na fase de indução de calos (fase I), houve o desenvolvimento de calos com características embriogênicas nos meios suplementados com 5,0 mg/L de 2,4-D; 1,0 mg/L de 2,4-D e 0,1 mg/L de BAP; 1,0 mg/L de 2,4-D e 1,0 mg/L de BAP e 2,0 mg/L de 2,4-D e 0,05 mg/L de BAP, que foram selecionados para o subcultivo em meio de regeneração (fase II). Nesta fase, foram utilizados meios de cultura suplementados com reduzidas concentrações de 2,4-D, BAP e AG₃, ou totalmente desprovidos destes, em que os calos permaneceram por mais 30 dias em cultivo. Os calos subcultivados nos meios de regeneração com 0,1 mg/L de BAP (R3) e 0,01 e 0,001 mg/L de BAP e 2,4-D respectivamente (R8), provenientes dos meios para indução, acrescidos de 5,0 mg/L de 2,4-D (M16) e 1,0 e 1,0 mg/L de BAP e 2,4-D (M30), desenvolveram estruturas semelhantes a embriões. No entanto, a caracterização histológica revelou a superioridade da interação entre os meios M30 e R8, para a regeneração de calos e embriões somáticos.

Termos para indexação: cultura de tecidos, calos, embriões somáticos.

IN VITRO SOMATIC EMBRYOGENESIS OF COMMON CABBAGE

ABSTRACT - The aim of this study was to obtain calluses and somatic embryos of common cabbage (*Brassica oleracea* L., var. *leucocephala*) and to characterize them by means of histological observations *in vitro*; foliar explants were cultivated under aseptic conditions in a nutritive MS medium supplemented with various combinations of 2,4-D/BAP and 2,4-D/KIN. During the induction phase of calluses (phase I), there was a development of calluses with embryogenic characteristics derived from the media (5.0 mg/L of 2,4-D), (1.0 mg/L of 2,4-D plus 0.1 mg/L of BAP), (1.0 mg/L of 2,4-D plus 1.0 mg/L of BAP) and (2.0 mg/L of 2,4-D plus 0.05 mg/L of BAP), that were chosen for subcultivation in regeneration media (phase II). In this phase, culture media were supplemented with reduced concentrations of 2,4-D, BAP and GA₃, or they were totally deprived of these supplements. In this case, the calluses remained in cultivation for other 30 days. The calluses that were subcultivated in the regeneration media R3 (0.1 mg/L of BAP) and R8 (0.001 mg/L of 2,4-D plus 0.01 mg/L of BAP), derived from the induction media M16 (5.0 mg/L of 2,4-D) and M30 (1.0 and 1.0 mg/L of 2,4-D and BAP), respectively, developed structures similar to embryos. However, this histological characterization revealed the superiority of the interaction between the M30 and R8 media for regeneration of the calluses and somatic embryos.

Index terms: tissue culture, calluses, somatic embryos.

INTRODUÇÃO

A embriogênese somática é definida como o processo de desenvolvimento de embriões a partir de células somáticas, ou seja, células que não são produto da fusão gamética (Dodds & Roberts, 1985). Embriões somáticos podem ser obtidos segundo dois padrões de desenvolvimento: a embriogênese somática indireta, na qual o calo é mantido formado e proliferado antes do desenvolvimento dos embriões, e a direta, em que os embriões

¹ Aceito para publicação em 2 de julho de 1999.

Extraído da dissertação de Mestrado apresentada pela primeira autora à UFRPE. Financiado pela Capes e IPA.

² Eng. Agrôn., M.Sc., R. Padre Anchieta, 473/601 Torre, CEP 50710-430 Recife, PE. E-mail: virginia@ipa.br

³ Quím., Dr., Prof. Adj., Dep. de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua D. Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-030 Recife, PE.

⁴ Biól., M.Sc., Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), Av. Gal. San Martín, 1371 Bongí, CEP 50761-000 Recife, PE.

⁵ Biól., M.Sc., Dep. de Botânica, CCB, UFPE, Av. Prof. Luiz Freire, 700, CEP 50740-540 Recife, PE.

se originam diretamente sobre a superfície do explante sem passar pela fase de proliferação de calo (Sharp et al., 1980; Mordhorst et al., 1997).

No caso da embriogênese indireta, o tecido cultivado desenvolve aglomerados de células que se dividem sucessivamente (calo), formando meristemóides ou nódulos vasculares que podem originar brotos, primórdios de raiz ou embriões (Dodds & Roberts, 1985). Para determinar se o processo de desenvolvimento é organogênico ou embriogênico, são utilizados, com frequência, em trabalhos desta natureza, estudos histológicos dos calos e estruturas regeneradas (Falco et al., 1996a, 1996b; Matsumoto et al., 1996).

O primeiro caso de embriogênese somática *in vitro* foi relatado por Steward et al. (1958), em tecidos de cenoura (*Daucus carota* L.). Desde então, vem sendo estudado o potencial embriogênico das mais variadas culturas. No que se refere às brássicas, a regeneração via cultivo *in vitro* se dá, na maioria das vezes, pela diferenciação ou organogênese direta ou indireta, como foi obtido por Dunwell (1981) em tecidos foliares de couve-comum (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*), de *B. napus* e *B. campestris*, ou a partir de segmentos de pedúnculo (Chrystey & Earle, 1991).

Lustinec & Horák (1970), por outro lado, relataram a obtenção de embriões somáticos de *B. campestris*. Huang et al. (1990) e Phippen & Ockendon (1990) conseguiram regenerar embriões a partir de micrósoros de *B. napus* e *B. campestris*, respectivamente, viabilizando assim o estabelecimento de metodologias para a obtenção de plantas haplóides.

Este trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo adequado para a regeneração de embriões somáticos a partir de tecido foliar de couve-comum e subsequente caracterização por meio de estudos histológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal utilizado neste trabalho, couve-comum (*B. oleracea* L. var. *acephala*), foi fornecido pelo programa de hortaliças do IPA (Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária). Como fonte de explante, foram utilizadas folhas imaturas coletadas em gemas

caulinares apicais e laterais de plantas transplantadas, com aproximadamente 20 dias, mantidas em telado.

Antes da secção dos explantes, as folhas foram submetidas a um processo de assepsia em álcool a 70% (v/v) por 1-3 minutos, e, em seguida, em hipoclorito de cálcio a 2% (p/v), por 15 minutos, e, finalmente, três lavagens em água destilada estéril.

Para indução de calos (fase I), foi utilizado o meio nutritivo MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com uma fonte de auxina, o 2,4-D, combinado com as citocininas BAP e KIN (Tabelas 1 e 2), em que os explantes permaneceram por 30 dias em cultivo em sala de crescimento, com temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 16 horas de luz e 8 horas de escuro. Foram realizados dois experimentos com 20 tratamentos e quatro repetições, sendo distribuídos de forma inteiramente casualizada.

As avaliações foram realizadas após 30 dias de cultivo, levando-se em consideração a presença e intensidade de regeneração dos calos, para os quais foram atribuídas as notas de 0, 1 e 2 no tocante a ausência de calo, pouco calo e muito calo, respectivamente, e no tocante à presença ou ausência de nódulos, 0 ou 1. Para analisar os dados obtidos, foi aplicada a análise não-paramétrica pelo Kruskal-Wallis Statistic.

TABELA 1. Combinações entre 2,4-D e KIN, em meio MS, utilizadas para promover o desenvolvimento de calos.

2,4-D (mg/L)	KIN (mg/L)				
	0,0	0,01	0,05	0,10	1,00
0,50	M1	M2	M3	M4	M5
1,00	M6	M7	M8	M9	M10
2,00	M11	M12	M13	M14	M15
5,00	M16	M17	M18	M19	M20

TABELA 2. Combinações entre 2,4-D e BAP, em meio MS, utilizadas para promover o desenvolvimento de calos.

2,4-D (mg/L)	BAP (mg/L)				
	0,0	0,01	0,05	0,10	1,00
0,50	M21	M22	M23	M24	M25
1,00	M26	M27	M28	M29	M30
2,00	M31	M32	M33	M34	M35
5,00	M36	M37	M38	M39	M40

Para a regeneração ou amadurecimento das estruturas semelhantes a embriões somáticos (fase II), utilizou-se o mesmo meio nutritivo, com a concentração de sacarose reduzida de 30 para 20 g/L e suplementado com reduzidas concentrações de 2,4-D, BAP e GA₃ ou totalmente desprovido destes (Tabela 3). Nesta fase, os calos provenientes da fase I, avaliados e selecionados como calos embriogênicos, foram subcultivados por mais 30 dias, nas mesmas condições. Todos os meios foram solidificados com ágar, e o pH foi ajustado para 5,9 antes da autoclavagem a 120°C por 15 minutos, para esterilização do meio de cultura.

O material usado para as observações histológicas foi fixado em Carnoy (ác. acético: álcool etílico - 1:3 v/v), durante 8 horas, e, após este período, mantidos em álcool a 70% (v/v) à temperatura ambiente. Os tecidos fixados foram desidratados e em seguida infiltrados e envolvidos em parafina, segundo Johansen (1950). O material foi cortado com 10-15 µm, para montagem das lâminas, que foram, parte, coradas com safranina e *fast green*, e parte, com hematoxilina eosina, para visualização dos núcleos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Indução de calos de aspecto embriogênico

As citocininas podem favorecer a produção de calos embriogênicos (Chée & Cantliffe, 1990), mas, em algumas famílias, por exemplo, nas Umbelliferae, parece que não são necessárias (Horák et al., 1975). No presente trabalho, verificou-se que a KIN foi

inefetiva para indução de calos embriogênicos, pois das 20 combinações entre 2,4-D e KIN somente foram selecionados os calos desenvolvidos nos meios desprovidos de KIN.

Mesmo assim, os calos provenientes dos meios acima referidos foram repicados, sendo parte submetida a observações histológicas, e parte subcultivada em meio para regeneração ou amadurecimento dos embriões, a partir do que, se verificou que os calos não apresentavam desenvolvimento de estruturas isoladas semelhantes a embriões somáticos, porém mostraram, nos estudos histológicos, que as células que constituíam os calos eram, na maioria, tipicamente embriogênicas. Ao contrário, para outras culturas, como o aipo (Willians & Collin, 1976), café (Sondahl & Sharp, 1977) e pepino (Chée, 1990), os autores observaram que entre outros reguladores de crescimento avaliados, a combinação entre 2,4-D e KIN apresentava maior frequência de indução, tanto de calos como do próprio embrião somático.

Por outro lado, quanto às combinações entre 2,4-D e BAP, verificou-se que até mesmo na presença das mais reduzidas concentrações de BAP, como nos meios suplementados com 0,01 e 0,05 mg/L, os calos apresentavam melhor desenvolvimento e características embriogênicas mais definidas, como os nódulos mais proeminentes em relação aos calos cultivados na presença de KIN (Fig. 1A). Esses nódulos estiveram presentes em 82% dos calos cultivados na presença do BAP, enquanto na presença da KIN, apenas 60% dos calos apresentavam nodulações pouco desenvolvidas.

De acordo com a análise estatística, não houve diferença significativa quanto à intensidade de calo e à presença ou ausência de nódulos, tanto entre os tratamentos que combinaram o 2,4-D e KIN (Tabela 4), como entre os que combinaram 2,4-D e BAP (Tabela 5). No entanto, foram selecionados os provenientes dos meios contendo 0,01 e 1,0; 0,1 e 1,0; 1,0 e 1,0; 0,05 e 2,0 mg/L de BAP e 2,4-D, respectivamente, pois apresentavam maior quantidade de calo de coloração amarelada, além da presença intensa de nódulos, características que são atribuídas a calos embriogênicos (Chée, 1990). Esses resultados foram semelhantes às observações realizadas por Quazi (1978) em brócolis, e Chée & Cantliffe (1990) em batata-doce. Ambos afirmam que a pre-

TABELA 3. Combinações entre 2,4-D, BAP e GA₃, em meio MS, utilizadas para regeneração dos embriões.

Meios	Suplementações (mg/L)		
	2,4-D	BAP	GA ₃
R1	0	0	0
R2		0,01	0
R3		0,1	0
R4	0,01	0	0
R5		0,01	0
R6		0,1	0,1
R7	0,001	0	0,1
R8		0,01	0
R9		0,100	0
R10		0,100	0,5

sença de 0,45 mg/L de BAP aumentou o percentual de proliferação de calos embriogênicos. Os calos selecionados foram subdivididos, sendo uma parte subcultivada em meios de regeneração (Fase II) e outra parte destinada às observações histológicas.

A partir das análises histológicas, verificou-se que apenas os calos cultivados nos meios suplementados com 0,1 e 1,0; 1,0 e 1,0; 0,05 e 2,0 mg/L de BAP e 2,4-D, respectivamente, apresentavam estruturas isoladas muito semelhantes a embriões somáticos (Figs. 1B, 1C e 1D). Subseqüentemente, observou-se que o meio que continha maior concentração de BAP (1,0 mg/L) destacou-se, por apresentar maior número de estruturas que mostravam tecido vascular bem formado, além de apresentar duas polaridades, que se constituíram em características muito evidentes de embriões somáticos.

As evidências de diferenciação de embriões somáticos apresentados neste trabalho foram baseadas em estudos histológicos dos calos cultivados com maior e menor concentrações de BAP, o que permitiu observar a presença de estruturas isoladas bem definidas, semelhantes a embriões somáticos, nos calos selecionados em meio de cultura com maior concentração de BAP (1,0 mg/L). Essas estruturas apresentavam dupla polaridade e vasos bem visíveis, conectando o pólo meristemático apical ao radicular (Fig. 1E).

Regeneração de estruturas semelhantes a embriões somáticos

Segundo observações realizadas neste trabalho, dos calos selecionados durante a fase de indução, apenas os provenientes do meio com

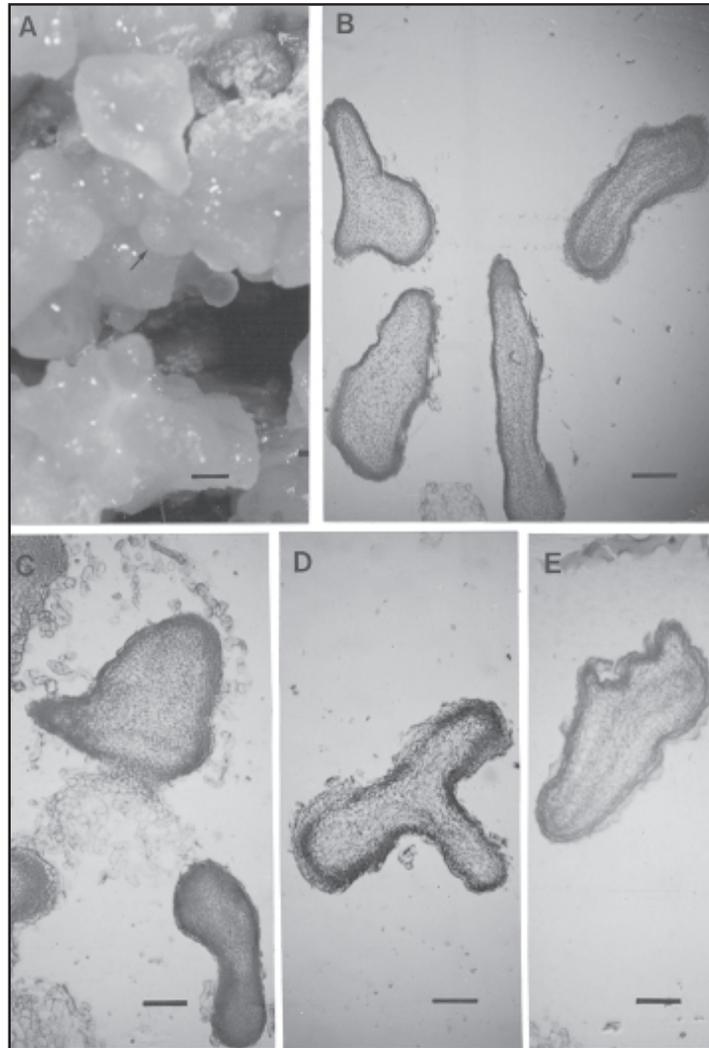


FIG. 1. Estudo histológico de calos embriogênicos, cultivados *in vitro* por 30 dias na presença de BAP e 2,4-D. A. Calo com característica embriogênica regenerado na presença de BAP (barra horizontal = 1 mm). B. Estrutura semelhante a embrião, proveniente de calos cultivados em meio de indução com 1,0 e 1,0 mg/L de BAP e 2,4-D respectivamente (barra horizontal = 300 μ m). C. Estrutura proveniente de calos cultivados em meio de indução com 0,1 e 1,0 mg/L de BAP e 2,4-D (barra horizontal = 300 μ m). D. Estrutura proveniente de calos cultivados em meio de indução com 0,05 e 2,0 mg/L de BAP e 2,4-D (barra horizontal = 300 μ m). E. Estrutura com dupla polaridade, proveniente de calos cultivados em meio de indução com 0,1 e 1,0 mg/L de BAP e 2,4-D (barra horizontal = 300 μ m).

5,00 mg/L de 2,4-D apresentaram características aparentes de diferenciação embriogênica, quando subcultivados em meios de regeneração (Fase II). Entre eles, apenas aquele com 0,1 mg/L de BAP destacou-se por promover o desenvolvimento de estruturas facilmente destacáveis, bem definidas e com dupla polaridade. Para melhor caracterização, esses calos e estruturas provenientes dos meios com 5,0 mg/L de 2,4-D na fase de indução de calo e 0,1 mg/L de BAP na fase de regeneração, foram submetidos a preparações e observações histológicas que confirmaram a habilidade embriogênica desse material, pela presença de estruturas que apresentavam tecido vascular bem formado e sem conexão com o calo de origem.

Da mesma forma, Nomura & Komamine (1985) observaram que embriões somáticos de cenoura foram induzidos pela transferência dos agregados de

células embriogênicas para meios de cultura que continham apenas citocinina. Ao contrário, Smith & Street (1974) e McWilliam et al. (1974) observaram que o desenvolvimento de embriões somáticos, também de cenoura, foi promovido pela transferência de calo de um meio contendo 2,4-D, para outro totalmente desprovido de reguladores de crescimento.

De acordo com Evans et al. (1981), se o desenvolvimento do calo foi iniciado e mantido em meio com 2,4-D, este deve ser utilizado para completar o processo de desenvolvimento dos embriões. Entre os calos pré-cultivados em meios que combinaram BAP e 2,4-D, os meios com 0,1 e 1,0; 1,0 e 1,0; 0,05 e 2,0 mg/L de BAP e 2,4-D, respectivamente, destacaram-se, na primeira fase, inicialmente, por apresentarem calos com nódulos mais proeminentes, e posteriormente, pela presença de células com características embriogênicas e com estruturas semelhantes a

TABELA 4. Representação qualitativa das respostas morfológicas observadas em explantes foliares após 30 dias de cultivo em meio nutritivo MS, suplementado com distintos níveis de KIN e 2,4-D¹.

Tratamentos	Média de calo	Média de nódulo
M1	34.250a	22.500a
M2	15.500a	22.500a
M3	34.250a	22.500a
M4	34.250a	22.500a
M5	43.625a	52.500a
M6	46.750a	42.500a
M7	53.000a	62.500a
M8	34.250a	42.500a
M9	34.250a	42.500a
M10	34.250a	22.500a
M11	40.500a	42.500a
M12	43.625a	52.500a
M13	34.250a	42.500a
M14	34.250a	42.500a
M15	53.000a	42.500a
M16	46.750a	42.500a
M17	53.000a	42.500a
M18	34.250a	42.500a
M19	53.000a	62.500a
M20	53.000a	42.500a

¹ Médias da mesma coluna seguidas pela mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de comparação múltipla.

TABELA 5. Representação qualitativa das respostas morfológicas observadas em explantes foliares após 30 dias de cultivo em meio nutritivo MS, suplementado com distintos níveis de BAP e 2,4-D¹.

Tratamentos	Média de calo	Média de nódulo
M21	28.250a	34.000a
M22	28.250a	34.000a
M23	36.625a	24.000a
M24	43.875a	54.000a
M25	52.250a	34.000a
M26	28.250a	44.000a
M27	43.875a	34.000a
M28	28.250a	34.000a
M29	51.125a	54.000a
M30	52.250a	54.000a
M31	59.500a	54.000a
M32	45.000a	54.000a
M33	52.250a	34.000a
M34	42.750a	54.000a
M35	45.000a	34.000a
M36	28.250a	34.000a
M37	28.250a	34.000a
M38	42.750a	34.000a
M39	28.250a	54.000a
M40	45.000a	40.000a

¹ Médias da mesma coluna seguidas pela mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de comparação múltipla.

embriões, constatadas nas análises histológicas. Durante a segunda fase, verificou-se que apenas os calos provenientes do meio constituído de 1,0 e 1,0 mg/L de BAP e 2,4-D, respectivamente, quando subcultivados em meio de regeneração com 0,001 mg/L de 2,4-D e 0,01 mg/L de BAP destacaram-se por promover o desenvolvimento de nódulos mais proeminentes, além de estruturas isoladas muito semelhantes a embriões (Fig. 2A).

Foi possível observar, mediante cortes longitudinais dos calos provenientes dos meios com 1,0 e 1,0 mg/L de BAP e 2,4-D (fase I) e 0,001 mg/L de 2,4-D e 0,01 mg/L de BAP (fase II), o desenvolvimento de um embrião somático, desde o início da organização celular do nódulo (Fig. 2B), passando pela fase intermediária, onde se verificou que o embrião somático em desenvolvimento se encontrava preso ao calo original, embora os vasos estivessem fechando a conexão com o mesmo (Fig. 2C). Chegou-se finalmente, à última fase, em que o embrião se encontrava isolado e totalmente independente, apresentando os meristemas radicular e apical conectados por vasos completamente formados semelhantes a embriões zigóticos (Fig. 2D). Desta forma, uma vez que essas estruturas assemelham-se a embriões zigóticos pelas suas similaridades morfológicas e histológicas, e considerando que elas não estabelecem conexão vascular com o calo de origem, segundo Haccius (1978), elas podem ser chamadas de embriões somáticos.

Quanto aos efeitos causados pela presença do AG₃ nos meios de cultura para regeneração (Fase II), observou-se que em todos os calos subcultivados na presença deste regulador de crescimento ocorreu uma estimulação expressiva de enraizamento, ou seja, os nódulos presentes nos calos diferenciaram-se em raiz. Resultado semelhante foi observado por Kochba et al. (1974), os quais denominaram de falsos nódulos os que na presença de AG₃ desenvolveram raiz. De acordo com Ammirato (1983), as giberelinas são utilizadas freqüentemente para promover a maturação ou estimular o enraizamento. Por outro lado, segundo Sharp et al. (1980), as giberelinas não têm efeito na frequência de embriogênese, embora afetem o índice de desenvolvimento dos embriões.

Características das células e calos embriogênicos

Foi possível observar, mediante estudos histológicos, duas categorias de células, uma das quais muito semelhante às células meristemáticas, o que

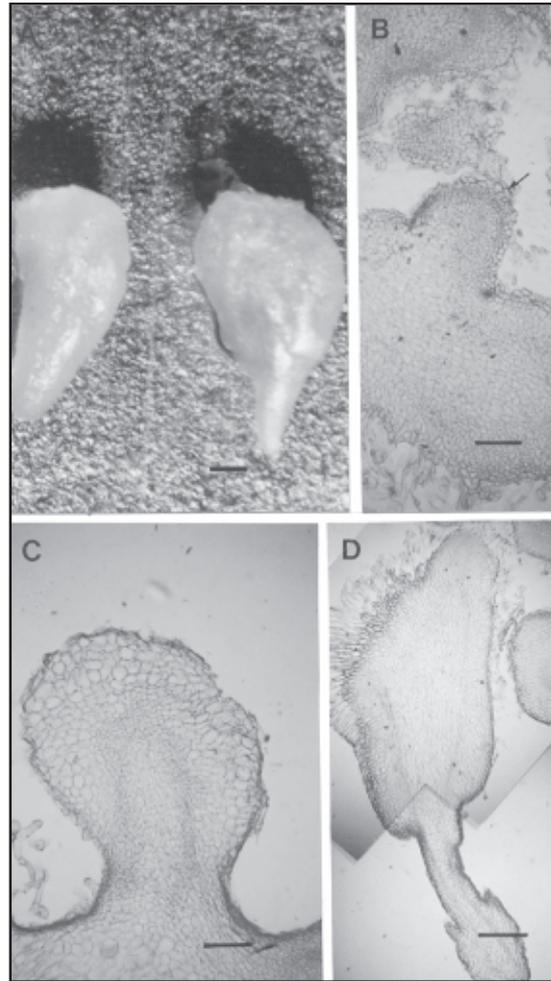


FIG. 2. Estudo histológico de estruturas embriogênicas, provenientes de calos cultivados *in vitro* nos meios com 1,0 e 1,0 (Fase I); 0,01 e 0,001 (Fase II) mg/L de BAP e 2,4-D, respectivamente. A. Estruturas isoladas (barra horizontal = 1 mm). B. Fase inicial do desenvolvimento de um embrião somático (nódulo) (barra horizontal = 300 µm). C. Pré-embrião, mostrando os vasos sem conexão com os calos de origem (barra horizontal = 300 µm). D. Embrião isolado com dupla polaridade (barra horizontal = 300 µm).

concorda com as observações de Sharp et al. (1980), quando afirmam que as células embriogênicas podem ser diferenciadas de outras dentro do calo, por sua semelhança morfológica com as células do meristema apical. Um outro tipo de célula observada apresentava formato não muito regular e com vacúolo grande, semelhante às descritas por El Maâtaoni et al. (1990) como células não-embriogênicas.

As células embriogênicas encontravam-se localizadas nos pontos de diferenciação, ou nódulos. Da mesma forma, McCain et al. (1988) afirmaram que embriões somáticos de milho surgiram de calos com superfície nodular, e constataram, por meio de análises histológicas, que estes nódulos eram constituídos de grupos de 2-8 células típicas que regeneravam embriões. Foi observado, por meio de estudos histológicos, que as células presentes nos calos com características embriogênicas também encontravam-se distribuídas em grupos de 3-8 células. Nomura & Komamine (1985) também relatam a presença de aglomerados embriogênicos distribuídos em grupos de 3-10 células, em culturas de cenoura.

CONCLUSÕES

1. A KIN não é a fonte de citocinina mais indicada para promover o desenvolvimento de calos embriogênicos em couve-comum.

2. A BAP demonstra ser a melhor fonte de citocinina para a promoção do desenvolvimento de estruturas semelhantes a embriões somáticos; o meio de cultura suplementado com 1,0 e 1,0 mg/L de BAP e 2,4-D respectivamente, é responsável pelo desenvolvimento de estruturas semelhantes a embriões em maior número e melhor definidas.

3. A interação entre o meio de cultura para indução de calos (1,0 mg/L de BAP e 1,0 mg/L de 2,4-D - fase I) e o meio para regeneração (0,01 de BAP e 0,001 mg/L de 2,4-D - fase II) é a mais eficiente para a promoção do desenvolvimento de estruturas semelhantes a embriões somáticos em couve-comum.

4. A presença do AG₃ nos meios de regeneração promove o desenvolvimento de raiz, sendo dispensada a sua utilização para regeneração de estruturas semelhantes a embriões somáticos em couve-comum.

REFERÊNCIAS

- AMMIRATO, P.V. Embryogenesis. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V. **Handbook of plant cell culture**. New York : MacMillan, 1983. p.82-123.
- CHÉE, P.P. High frequency of somatic embryogenesis and recovery of fertile cucumber plants. **HortScience**, Alexandria, v.25, n.7, p.792-793, 1990.
- CHÉE, P.P.; CANTLIFFE, D.J. Selective enhancement of *Ipomoea batatas* poir embryogenesis and non-embryogenic callus growth and production of embryos in liquid culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.15, p.795-797, 1990.
- CHRYSTEY, M.C.; EARLE, E.D. Regeneration of *Brassica oleracea* from peduncle explants. **HortScience**, Alexandria, v.26, n.8, p.1069-1072, 1991.
- DODDS, J.H.; ROBERTS, L.W. **Experiments in plant tissue culture**. 2.ed. Cambridge : Cambridge University, 1985. 216p.
- DUNWELL, J.M. *In vitro* regeneration from excised leaf discs of three *Brassica* species. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.32, n.129, p.789-799, Aug. 1981.
- EL MAÂTAONI, M.; ESPAGNAC, H.; MICHOUX-FERRIÈRE, N. Histology of callogenesis and somatic embryogenesis induced in stem fragments of cork oak (*Quercus suber*) culture *in vitro*. **Annals of Botany**, London, v.66, p.183-190, 1990.
- EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; FLICK, C.E. Growth and behaviour of cell culture: embryogenesis and organogenesis. In: THORP, T.A. (Ed.). **Plant tissue culture: methods and applications in agriculture**. New York : Academic, 1981. 379p.
- FALCO, M.C.; MENDES, B.M.J.; TULMANN NETO, A. Cell suspension culture of sugarcane: growth, management and plant regeneration. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.8, n.1, p.1-6, 1996a.
- FALCO, M.C.; MENDES, B.M.J.; TULMANN NETO, A.; GLORIA, B.A. da. Histological characterization of *in vitro* regeneration of *Saccharum* sp. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.8, n.2, p.93-97, 1996b.
- HACCIUS, B. Question of uncellular origin of non-zygotic embryos in callus cultures. **Phytomorphology**, Jodhpur, v.8, p.74-81, 1978.

- HORÁK, J.; LUSTINEC, J.; MESICEK, J.; KAMÍNEK, M.; POLACKOVA, D. Regeneration of diploid and polyploid plants from the stem pith explants of diploid marrow stem Kale (*Brassica oleracea* L.). **Annals of Botany**, London, v.39, p.571-577, 1975.
- HUANG, B.; BIRD, S.; KEMBLE, R.; SIMMONDS, D.; KELLER, W.; MIKI, B. Effects of culture density, conditioned medium and feeder cultures on microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. Topas. **Plant Cell Reports**, New York, v.8, n.10, p.594-597, 1990.
- JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York : McGraw-Hill, 1950. 528p.
- KOCHBA, J.; BUTTON, J.; SPIEGEL-ROY, P.; BORNMAN, C.H.; KOCHBA, M. Stimulation of rooting of citrus embryoids by gibberelic acid and adenine sulfate. **Annals of Botany**, London, v.38, p.795-802, 1974.
- LUSTINEC, J.; HORÁK, J. Induced regeneration of plants in tissue cultures of *Brassica oleracea*. **Experientia Supplementum**, Basel, v.26, n.8, p.919-920, 1970.
- McCAIN, J.W.; KAMO, K.K.; RODGE, T.K. Characterization of somatic embryo development and plant regeneration from friable maize callus culture. **Botanical Gazette**, Chicago, v.149, n.1, p.16-20, 1988.
- McWILLIAM, A.A.; SMITH, S.M.; STREET, H.E. The origin and development of embryos in suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.) **Annals of Botany**, London, v.38, p.243-250, 1974.
- MATSUMOTO, T.K.; WEBB, D.T.; KUEHNLE, A.R. Histology and origin of somatic embryos derived from antherium andraeanum Linden ex Andre Lamina. **American Society for Horticultural Science Journal**, Alexandria, v.121, n.3, p.404-407, 1996.
- MORDHORST, A.P.; TOONEN, M.A.J.; VRIES, S.C. Plant Embryogenesis. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v.16, n.8, p.535-576, 1997.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- NOMURA, K.; KOMAMINE, A. Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. **Plant Physiology**, Bethesda, v.79, p.988-991, 1985.
- PHIPPEN, C.; OCKENDON, D.J. Genotype, plant, bud size and media factors affecting anther culture of cauliflowers (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.79, p.33-38, 1990.
- QUAZI, H.M. Regeneration of plants from anthers of broccoli (*Brassica oleracea* L.). **Annals of Botany**, London, v.42, p.473-475, 1978.
- SHARP, W.R.; SONDAHL, M.R.; CALDAS, L.S.; MARAFFA, S.B. The physiology of in vitro asexual embryogenesis. **Horticultural Review**, New York, v.2, p.268-310, 1980.
- SMITH, D.L.; STREET, H.E. The decline of embryogenic potential as callus and suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.) are serially subcultured. **Annals of Botany**, London, v.38, p.223-241, 1974.
- SONDAHL, M.R.; SHARP, W.R. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.81, p.395-408, 1977.
- STEWART, F.C.; MAPES, M.O.; MEARS, K. Growth of organized development of culture cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. **American Journal of Botany**, Columbus, v.45, p.704-708, 1958.
- WILLIAMS, L.; COLLIN, H.A. Embryogenesis and plantlet formation in tissue cultures of celery. **Annals of Botany**, London, v.40, p.325-332, 1976.