

## Indução de embriogênese somática em genótipos de batata-doce

Janaina S Magalhães<sup>1</sup>; Maria do Desterro M dos Santos<sup>2</sup>; Francisco N da Cunha Filho<sup>2</sup>; Lucimara Blumer<sup>2</sup>; Miguel Pedro Guerra<sup>3</sup>; Antônio Carlos Torres<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade de Brasília, Dep<sup>o</sup>. Botânica, C. Postal 4457, 70919-970 Brasília-DF; <sup>2</sup>Embrapa Hortaliças, C. Postal 218, 70359-970 Brasília-DF; <sup>3</sup>Universidade Federal de Santa Catarina, Dep<sup>o</sup>. Fitotecnia. \*Autor para correspondência. E-mail: torres@cnp.hembrapa.br

### RESUMO

A diferenciação e o desenvolvimento de embriões somáticos foram observados em 15 genótipos de batata-doce a partir de explantes de ápices caulinares com um ou dois primórdios foliares. A embriogênese foi induzida utilizando o meio composto de sais minerais MS e vitaminas, 3% de sacarose, 0,2% de phytigel, suplementado com 2,4-D (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg/L). As culturas foram mantidas no escuro à temperatura de 27°C. A adição de 2,4-D foi necessária para a indução de calo embriogênico nos genótipos '92', '94', '184', '188', '319', '370', '374', '442', '449', '5491', '594', '645', 'PI3138463', 'White Star' e 'Jewel'. Os clones '169', '202', '605', '633' e '643' não responderam à indução de calo embriogênico. Os calos embriogênicos apresentaram a coloração amarelo claro, textura compacta e granular, enquanto que os calos não embriogênicos apresentaram coloração hialina e consistência friável. Os calos formaram-se na região periférica dos explantes. Nas condições estabelecidas, melhor produção de calo embriogênico foi obtida com 2,0 mg/L de 2,4-D. A transferência desses calos para meio sem 2,4-D favoreceu o desenvolvimento dos embriões para os estádios cordiforme, torpedado e cotiledonar.

**Palavras-chave:** *Ipomoea batatas*, embriogênese adventícia, micropropagação, cultura de tecidos.

### ABSTRACT

#### Induction of somatic embryogenesis in sweet potato genotypes

The differentiation and development of somatic embryos were observed in 15 genotypes of sweet potato using shoot tip explants with one or two leaf primordia. Somatic embryogenesis was induced using MS media and vitamins, 3% sucrose, 0,2% phytigel, supplemented with 2,4-D (0,0; 0,5; 1,0 and 2,0 mg/L). The cultures were maintained in the dark at 27°C. The addition of 2,4-D was necessary for embryogenic callus induction in the genotypes '92', '94', '184', '188', '319', '370', '374', '442', '449', '549', '594', '645', 'PI3138463', 'White Star' and 'Jewel'. Clones '169', '202', '605', '633' and '643' did not respond to embryogenic callus induction. Embryogenic callus showed a yellow and opaque color, compact and granular texture. Nonembryogenic callus was translucent in color and friable. Calluses were originated at the periphery of explants. In the established conditions better formation of embryogenic calluses was obtained with 2,0 mg/L of 2,4-D. The transfer of embryogenic callus to 2,4-D free medium allowed embryo development to heart, torpedo and cotyledonary stages.

**Keywords:** *Ipomoea batatas*, adventive embryogenesis, micropropagation, tissue culture.

(Recebido para publicação em 22 de março de 2005; aceito em 10 de fevereiro de 2006)

A batata-doce é uma hortaliça de propagação vegetativa, via estacas, retiradas de genótipos selecionados. A qualidade fitossanitária do campo de produção de batata-doce depende da qualidade fitossanitária do material utilizado para propagação. Por essa razão, a batata-doce pode acumular, entre gerações de multiplicação, diversos patógenos, principalmente, vírus. Uma das estratégias para contornar a limitação de produção de mudas com alta qualidade fitossanitária é o uso de métodos *in vitro* de propagação. Dentre esses, destaca-se a embriogênese somática que tem o potencial de ser usada para produção em larga escala de genótipos elites, em pequena área de laboratório, com custo competitivo aos métodos tradicionais (Murashige, 1977). Essa técnica possibilita a fixação do ganho genético pela captura dos componentes aditivos e não aditivos da variabilidade genética (Guerra *et al.*, 1999) e também pode ser

empregada na transformação genética de plantas.

São poucos os relatos na literatura sobre embriogênese somática de batata-doce e na maioria foi empregada a cultivar White Star (não comercial) usada para a produção de biomassa (Liu & Cantliffe, 1984a, 1984b; Cantliffe *et al.*, 1987; Raymond & Cantliffe, 1988, 1989). Não há referências sobre a embriogênese somática em genótipos nacionais dessa espécie.

Procurou-se identificar genótipos de batata-doce do banco de germoplasma da Embrapa Hortaliças factíveis à embriogênese somática e estudar as condições de cultura para indução de calo embriogênico e produção de embriões somáticos.

### MATERIAL E MÉTODOS

Genótipos comerciais de batata-doce do banco de germoplasma da Embrapa

Hortaliças ('92', '94', '184', '188', '202', '319', '370', '374', '442', '449', '549', '594', '605', '633', '643', '645', 'PI3138463' e as cultivares Jewel e White Star) foram utilizados como fonte de explantes para indução da embriogênese somática.

Inicialmente foi testada, como referência, a metodologia proposta por Cantliffe *et al.* (1987) para indução de calo embriogênico na cultivar White Star de batata-doce. Explantes constituídos do meristema apical com dois primórdios foliares e porção subadjacente do caule foram excisados de plantas desenvolvidas em casa-de-vegetação, e cultivados no meio básico contendo sais minerais de Murashige & Skoog (1962), com 3% sacarose, 0,2% de phytigel e, em mg/L: tiamina.HCl, 1,0; piridoxina.HCl, 0,5; ácido nicotínico, 0,5; e glicina, 2,0. Esse meio foi suplementado com 2,0 mg/L de 2,4-D. O pH do meio foi ajustado a 5,7 ±

**Tabela 1.** Efeito da concentração de 2,4-D na percentagem de calos embriogênicos formados, em explantes de ápice caulinar (com dois primórdios foliares) de diferentes genótipos de batata-doce, aos 60 dias de cultura. Brasília, Embrapa Hortaliças, 2003.

Explante	Genótipos	Percentagem calo embriogênico em concentrações de 2,4-D (mg/L)			
		0,0	0,5	1,0	2,0
Ápice caulinar	'92'	0 (0-30)	90 (55-99)	100 (69-100)	100 (69-100)
	'94'	0 (0-30)	70 (34-93)	80 (44-97)	90 (55-99)
	'188'	0 (0-30)	100 (69-100)	90 (69-100)	100 (69-100)
	'449'	0 (0-30)	50 (18-81)	60 (26-87)	60 (26-87)
	'594'	0 (0-30)	40 (12-73)	60 (26-87)	90 (69-100)
	'White Star'	0 (0-30)	90 (55-99)	90 (55-99)	90 (55-99)
	'Jewel'	0 (0-30)	40 (12-73)	80 (44-97)	80 (44-97)

\*Números em parêntese denotam 95% de intervalo de confiança

0,1. Os meios foram autoclavados, durante quinze minutos, a 121°C e 105 KPa, e distribuídos em placas de Petri de 100 mm de diâmetro, na quantidade de 25 ml por placa. Em cada placa de Petri foram inoculados 10 explantes. As culturas foram mantidas no escuro, por 30 dias, a 27°C e repicadas a cada 30 e 60 dias para meio de idêntica composição. Aos 90 dias, as culturas foram transferidas para meio básico sem reguladores de crescimento e transferidas para câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 horas com densidade de fluxo de fótons de 32  $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , a 27°C. As cultivares embriogênicas foram identificadas 30 dias após a última transferência.

Em seguida, foram escolhidos os genótipos 'White Star' e '94' para determinar o efeito do tamanho do explante na formação de calo embriogênico. Foram utilizados explantes, respectivamente, constituídos de um e dois primórdios foliares bem como dois primórdios e uma folha emergente aderidos ao ápice caulinar. Os explantes foram cultivados no meio básico descrito acima, e nas mesmas condições de fotoperíodo e temperatura. Foi identificada a presença ou ausência de calo embriogênico nos diferentes explantes depois de 90 dias em cultura.

Após identificação dos genótipos factíveis à embriogênese somática e o melhor tamanho de explante, foram utilizados os genótipos '92', '94', '188', '449' e 'White Star' para determinação da resposta de diferentes explantes (ápice caulinar com dois primórdios foliares, porções de folhas, segmentos nodais e

de raiz, sendo os três últimos oriundos de plantas desenvolvidas *in vitro*) em função de concentrações de 2,4-D (0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg/L), na percentagem de calo embriogênico formado. O pH dos meios foi ajustado para 5,7. Após autoclavagem (15 minutos, a 121°C e 105 KPa) os meios foram distribuídos em placas de Petri de 100 mm de diâmetro, na quantidade de 25 ml por placa. As culturas foram mantidas em câmara de crescimento, no escuro a 27°C. Após 30 dias da inoculação, as culturas foram subcultivadas para meio de mesma composição. Cada parcela consistiu de uma placa de Petri com 10 explantes. Aos 60 dias da inoculação foi determinada a porcentagem de calo embriogênico formado com o respectivo intervalo de confiança.

Em seguida, foram utilizados os genótipos 'PI3138463', '92', '94', '188', '442' e '449' para determinar a massa fresca de calo embriogênico em função da concentração de 2,4-D (0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg/L), adicionadas ao meio básico. Ajustou-se o pH de cada meio para 5,7. Após autoclavagem (15 minutos, 121°C e 105 KPa), os meios foram distribuídos em placas de Petri de 100 mm de diâmetro, na quantidade de 25 ml por placa. As culturas foram mantidas em câmara de crescimento, no escuro a 27°C. Após 30 e 60 dias da inoculação, as culturas foram subcultivadas para meio de mesma composição. Avaliou-se a massa fresca de calo embriogênico formado por explante. Empregou-se o delineamento experimental inteiramente ao acaso com os tratamentos dispostos no esquema

fatorial 6 x 4 (seis genótipos de batata-doce e quatro concentrações de 2,4-D) com 18 repetições (explantes). A análise do conjunto de dados indicou que a pressuposição referente a homogeneidade de variâncias não foi satisfeita, verificando-se que essa heterogeneidade foi devido haver uma relação entre a média e a variância, sendo portanto necessário realizar a transformação dos dados antes da análise de variância. A função estabilizadora da variância, encontrada em função do valor do coeficiente de regressão linear simples, foi a logarítmica  $\log(x+1,0)$ . A análise estatística teve prosseguimento com a aplicação do teste de Tukey ( $p \leq 5\%$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Calos embriogênicos de batata-doce foram obtidos nos clones '92', '94', '184', '188', '319', '370', '374', '442', '449', '549', '594', '645', 'PI3138463' e nas cultivares 'Jewel' e 'White Star', em meio suplementado com 2,0 mg/L de 2,4-D. Os genótipos '169', '202', '605', '633' e '643' não apresentaram resposta embriogênica, sugerindo que a habilidade de formar embrião somático em batata-doce não é uma propriedade intrínseca da espécie, mas específica por genótipo. Tal fenômeno tem sido documentado em outras espécies, tais como: *Triticum aestivum* (Maddock *et al.*, 1983), *Ipomoea batatas* (Jarret *et al.*, 1984), *Calamus merrillii* e *C. subinermis* (Goh *et al.*, 2001). Do mesmo modo genótipos individuais da mesma espécie podem apresentar exigências específicas para capacidade ótima de regeneração (Debeaujon & Branchard, 1993; Merkle *et al.*, 1995).

Foi observado que o tamanho do ápice caulinar foi determinante na indução de calo embriogênico na cultivar 'White Star' e no genótipo '94'. Calos originados de ápices caulinares com um ou dois primórdios foliares formaram calo embriogênico. Explantes com dois primórdios e uma folha emergente não produziram calo embriogênico (dados não apresentados). Resultados semelhantes foram obtidos por Cantliffe *et al.* (1987) em batata-doce 'White Star', onde a percentagem de calo embriogênico diminuía com o

**Tabela 2.** Efeito de concentrações de 2,4-D, na produção de massa fresca de calo embriogênico de cinco genótipos de batata-doce, em explante constituído do ápice caulinar com dois primórdios foliares, após 90 dias em cultura. Brasília, Embrapa Hortaliças, 2003.

Massa fresca do calo embriogênico em mg							
Genótipo							
2,4-D (mg/L)	PI3138463	188	92	94	449	442	Média de dose
0	0 Aa	0 Aa	0 Aa	0 Aa	0 Aa	0 Aa	0 a
0,5	0,8043Ab	0,7875Ab	0,7199ABb	0,7527ABb	0,6797Bb	0,6838Bb	0,7384b
1,0	0,8786ABbc	0,9108Ac	0,7997Bbc	0,7285BCb	0,73BCb	0,6785Bb	0,7981c
2,0	0,9579Ac	0,8895ABc	0,8118Bc	0,8734ABc	0,8374Bc	0,6381Cb	0,8452d
Média de genótipo	0,8803A	0,8631A	0,7771B	0,7866B	0,7562B	0,6690C	

Médias seguidas de letras distintas maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas diferem entre si ao nível de 5% pelo teste Tukey. Os dados foram transformados usando  $\log(x+1)$ .

aumento do número de primórdios foliares do explante. Esses autores mostraram que ápices com até dois primórdios foram os explantes eficientes para indução de calo embriogênico e formação de embriões somáticos em batata-doce 'White Star'. Trabalhos subsequentes de Cantliffe e colaboradores utilizaram como rotina explantes com dois primórdios foliares na indução de embriogênese somática na cultivar 'White Star' (Raymond & Cantliffe, 1988).

Nos genótipos embriogênicos, o ápice caulinar com dois primórdios foliares foi o explante mais eficiente para a indução de calos embriogênicos e produção de embriões somáticos em comparação com explantes de folhas, segmentos de caule e raiz excisados de propágulos de batata-doce desenvolvidos *in vitro*, os quais não formaram embriões somáticos. A Tabela 1 mostra a produção de calo embriogênico em diferentes genótipos de batata-doce, utilizando-se explantes constituídos do ápice caulinar com dois primórdios foliares. A influência do tipo de explante no sucesso de um protocolo embriogênico tem sido relatada na literatura (Chée *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1995).

Também foi constatado (Tabela 1) que a adição de 2,4-D foi necessária para a indução de calo embriogênico em explantes de ápices caulinares, com dois primórdios foliares. Em meio desprovido de 2,4-D não ocorreu a diferenciação dos explantes em calo. As concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/L de 2,4-D foram efetivas na percentagem de calos embriogênicos formado nos genótipos testados, que variou de 40 a 100%, não havendo diferença estatística entre elas. Essas porcentagens podem ser conside-

radas altas ao se comparar com as relatadas em outras espécies como *Pinus pinaster*, com média de 15% (Bercetche & Pâques, 1995, citados por Haggman *et al.*, 1999); *Pinus strobus*, que variou de 2,6% a 23% (Garin *et al.*, 1998); e *Pinus sylvestris*, variando entre 0,2% e 4% (Haggman *et al.*, 1999).

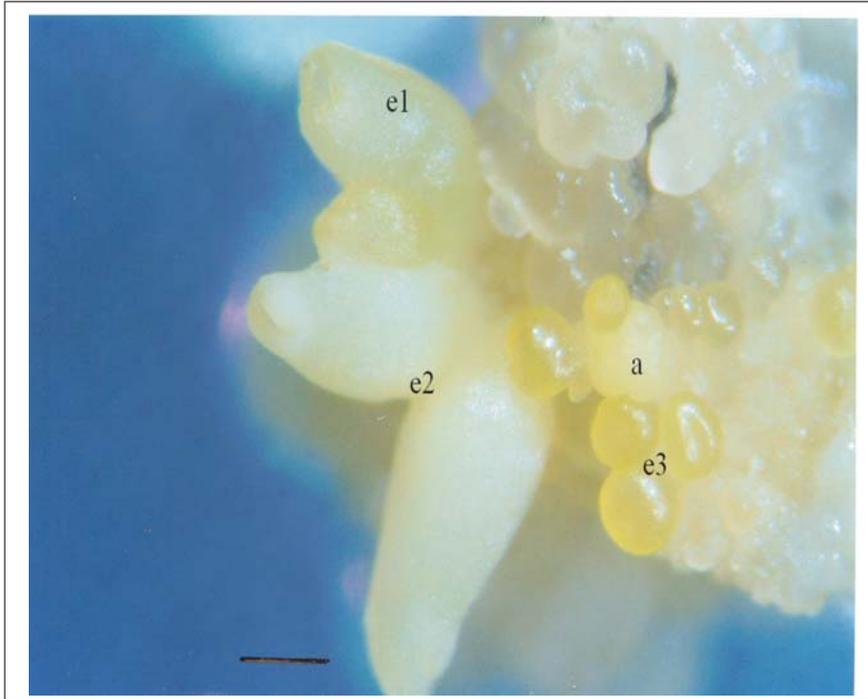
A adição de 2,4-D para indução de calo embriogênico em espécies de plantas dicotiledôneas tem sido relatada na literatura (Halperin & Wetherell, 1964; Vasil, 1982; Wang *et al.*, 1984; Tabei *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 2001). Em aproximadamente 60% das espécies que respondem à embriogênese somática em dicotiledôneas foi empregado meio com 2,4-D (Vasil, 1982). Em cenoura, Halperin & Wetherell (1964) observaram que o 2,4-D induz o desenvolvimento do embrião até o estágio de desenvolvimento globular. O desenvolvimento subsequente do embrião foi em meio desprovido de auxina. Já na conífera *Pinus sylvestris*, o meio mais efetivo foi o de 2,4-D (13,6  $\mu\text{M}$  ou 9,1  $\mu\text{M}$ ) em combinação com 2,2  $\mu\text{M}$  BAP (6-benzilaminopurina) (Haggman *et al.*, 1999). Uma das explicações da influência do 2,4-D na embriogênese somática de genótipos embriogênicos é que as auxinas promovem a desdiferenciação celular, com reativação de divisões celulares via a coordenação da expressão de genes e modificações pós-transcricionais de proteínas regulatórias envolvidas no controle do ciclo celular (Dudits *et al.*, 1995), e que essa resposta pode depender da fonte de explante usado no experimento (Zimmerman, 1993). A manutenção das culturas por longo período em meio com 2,4-D pode causar variações genéticas que afetam o poten-

cial embriogênico (Caligari & Shohet, 1993). Em batata-doce, os embriões somáticos perdem a capacidade de se converter em plantas quando as culturas são mantidas por longos períodos em meio com 2,4-D (Guerra *et al.*, 1999).

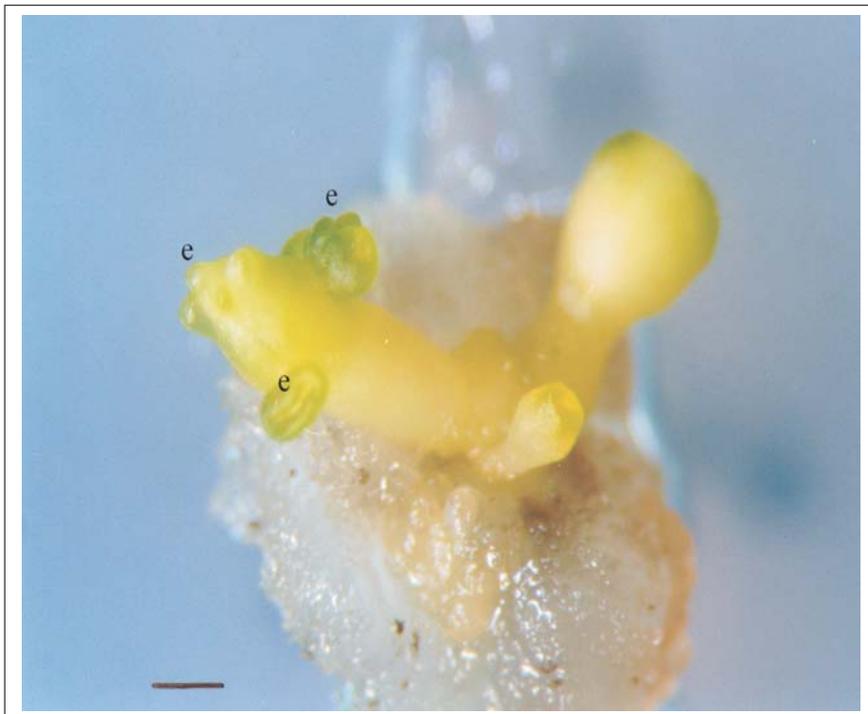
A análise de variância dos dados de massa fresca de calo embriogênico transformados ( $\log(x+1)$ ), indicou que houve diferença significativa em relação à dose, genótipo e interação entre esses fatores, com um C.V. de 12,5%. Dessa forma, a análise estatística teve continuidade com a aplicação do teste de Tukey (Tabela 2).

Maior massa fresca de calo embriogênico foi obtida nos genótipos 'PI3138463' e '188', os quais não diferiram entre si. O genótipo '442' foi o que apresentou menor resposta de produção de calo embriogênico, diferindo de todos os demais. A concentração de 2,0 mg/L de 2,4-D proporcionou maior massa fresca, não diferindo do tratamento com 1,0 mg/L nos genótipos 'PI3138463' e '92', e diferindo dos genótipos '94' e '449'. Entretanto, no genótipo '442' não apresentou diferença de massa fresca nas concentrações de 2,4-D testadas. Independente do genótipo utilizado, houve maior formação de calo embriogênico em meio com 2,0 mg/L de 2,4-D (Tabela 2).

Nos genótipos avaliados, a embriogênese somática foi indireta. Inicialmente, ocorreu o entumescimento do explante em cultura. Entre 15 e 60 dias após a inoculação foi formado um calo na periferia do explante. Análise morfológica desse calo mostrou a presença de duas regiões distintas: uma de coloração amarelo-escuro, de aspecto granular, com capacidade embriogênica,



**Figura 1.** Genótipo 442 em meio básico suplementado com 1,0 mg/L de 2,4-D com 90 dias em cultura. Embriões somáticos com expansão do hipocótilo e formação de pequenos cotilédones (e2), embrião com um único cotilédone cilíndrico (e1), embriões formando sobre massa embriogênica (e3), massa embriogênica (a). Bar = 0,5mm. Brasília, Embrapa Hortaliças, 2003.



**Figura 2.** Gemação e/ou embriogênese somática secundária representado por “e”. Genótipo PI3138463 em meio suplementado com 1,0 mg/L de 2,4-D com 70 dias em cultura. Bar = 0,5 mm. Brasília, Embrapa Hortaliças, 2003.

e outra de coloração translúcida com consistência friável e não embriogênica.

Nos genótipos ‘92’, ‘94’, ‘319’, ‘442’, ‘449’, ‘594’, ‘645’ e ‘PI3138463’

embriões somáticos foram diferenciados do calo embriogênico e desenvolveram em meio básico MS suplementado com 2,4-D. Nos demais genótipos (‘184’, ‘188’, ‘370’, ‘374’ e ‘549’), o desenvolvimento de embriões somáticos ocorreu quando os calos embriogênicos foram transferidos para meio sem auxina. Acredita-se que na presença contínua de auxina, o calo embriogênico expressa os genes necessários para completar o estágio de desenvolvimento globular e também contém os mRNA e proteínas que na presença de auxina inibem a formação de embriões maduros. A remoção da auxina inativa tais genes e os embriões podem completar o seu desenvolvimento (Zimmerman, 1993).

O desenvolvimento dos embriões somáticos seguiu a seqüência dos estádios globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar. Também foi verificada a formação de embriões no estágio cotiledonar fusionados pela base. Embriões com expansão do hipocótilo e formação de pequenos cotilédones e embriões com cotilédones fusionados (cupuliforme) são mostrados na Figura 1. Os primeiros foram chamados de embriões no estágio torpedo expandido por Raymond & Cantliffe (1988) e formaram plantas normais. Também foi observada a formação de embrião com desenvolvimento extensivo do cotilédone (aproximadamente,  $\frac{3}{4}$  do embrião) e um pequeno hipocótilo. Vários trabalhos descrevem anormalidades observadas na embriogênese somática *in vitro*, por exemplo: embriões fundidos (Hu & Sussex, 1971), com cotilédones múltiplos, fundidos, de tamanho e forma diferentes; e cotilédones cilíndricos (Halperin & Etherell, 1964; Rao, 1965; Chée & Cantliffe, 1988). Goh et al. (1999) relataram que a presença de alta concentração de reguladores de crescimento antes e durante a maturação de pró-embriões pode ser a causa de tais anormalidades. Do mesmo modo, a manutenção por longo período de tempo do calo embriogênico em meio com 2,4-D pode favorecer a ocorrência de variações genéticas (Caligari e Shohet, 1993, citados por Guerra *et al.*, 1999).

Além desses estádios não característicos de embrião normal, foi notada a

formação de embriões secundários a partir de embriões pré-existentes (Figura 2). Embriogênese somática secundária tem sido relatada em embriões somáticos de *Calamus merrillii* (Goh *et al.*, 2001) e *Calamus manan* (Goh *et al.*, 1999) e *Euterpe edulis* (Guerra e Handro, 1998), dentre outras.

A variação de formação de calos embriogênicos no mesmo tratamento (Tabela 1) se deve aos gradientes hormonais presentes na planta e dentre as plantas usadas como fontes de explantes. Por conseguinte, os explantes não respondem da mesma maneira ao efeito do tratamento.

Conforme descrito, em batata-doce os embriões somáticos apresentam grande variabilidade quanto a sua origem, desenvolvimento e morfologia.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pelas bolsas e apoio financeiro recebidos.

## LITERATURA CITADA

- BROWN DC; FINSTAD KI; WATSON EM. 1995. Somatic embryogenesis in herbaceous dicots. In: THORPE TA (Ed.). *In vitro embryogenesis in plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers p. 345-415.
- CALIGARI PDS; SHOET S. 1993. Variability in somatic embryos. In: REDENBAUGH K (Ed.). *Synseeds: application of synthetic seeds in crop improvement*. Boca Raton: CRC Press p. 163-174.
- CANTLIFFE DJ; LIN JR; SCHULTHEIS JR. 1987. Development of artificial seeds of sweet potato for clonal propagation through somatic embryogenesis. In: SMITH WH; FRANK JR (Ed.). *Methane for Biomassa System Approach*. New York: Elsevier Applied Pub. Ltda. p. 183-195.
- CHEE RP; CANTLIFFE DJ. 1988. Somatic embryony patterns and plant regeneration in *Ipomoea batatas* Poir. *In Vitro Cellular Developmental Biology - Plant*, 24: 955-958.
- CHEE RP; SCHULTHEIS JR; CANTLIFFE DJ. 1992. Micropropagation of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). In: BAJAJ YPS (Ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Berlin: Springer – Verlag p. 107-117.
- DEBEAUJON I; BRANCHARD M. 1993. Somatic embryogenesis in Cucurbitaceae. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 34: 91-100.
- DUDITS D; GYÖRGYÉY J; BÖGRE L; BAKÓ L. 1995. Molecular biology of somatic embryogenesis. In: THORPE TA (Ed.). *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. p. 267-280.
- GARIN E; ISABEL N; PLOURDE A. 1998. Screening of large numbers of seed families of *Pinus strobus* L. for somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos. *Plant Cell Reports*, 18: 37-43.
- GOH DKS; MICHAUX-FERRIÈRE OM; BON MC. 1999. Evidence of somatic embryogenesis from root tipo explants of the rattan *Calamus manan*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 35: 424-427.
- GOH DKS; BON MC; ALIOTTI F; ESCOUTE J; FERRIÈRE N; MONTEUUIS O. 2001. In vitro somatic embryogenesis in two major rattan species: *Calamus merrillii* and *Calamus subinermis*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 37: 375-381.
- GUERRA MP; HANDRO W. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpes edulis* Mart. (Palmae): control and structural features. *Journal of Plant Research*, 111: 65-71.
- GUERRA MP; TORRES AC; TEIXEIRA JB. 1999. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES AC; CALDAS LS; BUSO JA. (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa Hortaliças, p. 533-568.
- HAGGMAN H; JOKELAA; KRAJNAKOVA J; KAUPPI A; NIEMI K; ARONEN T. 1999. Somatic embryogenesis of scots pine: cold treatment and characteristics of explants affecting induction. *Journal of Experimental Botany*, 50: 1769-1778.
- HALPERIN W; WETHERELL DF. 1964. Adventive embryony in tissue cultures of the wild carrot, *Daucus carota*. *American Journal of Botany*, 51: 274-283.
- HU CY; SUSSEX IM. 1971. In vitro development of embryoids on cotyledons of *Ilex aquifolium*. *Phytomorphology*, 21: 103-107.
- JARRET RL; SATAZAR S; FERNUNDEZ RZ. 1984. Somatic embryogenesis in sweet potato. *Horticulture Science*, 19: 397-398.
- LEE EK; CHO DY; SOH WY. 2001. Enhanced production and germination of somatic embryos by temporary starvation in tissue cultures of *Daucus carota*. *Plant Cell Reports*, 20: 408-415.
- LIU JR; CANTLIFFE DJ. 1984a. Improved efficiency of somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas* Poir). *HortScience*, 19: 589.
- LIU JR; CANTLIFFE DJ. 1984b. Somatic embryogenesis and regeneration in tissue cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas* Poir). *Plant Cell Reports*, 3: 112-115.
- MADDOCK SE; LANCASTER VA; RISIOT R; FRANKLIN J. 1983. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescence of 25 cultivars of wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Experimental Botany*, 34: 915-926.
- MERKLE SA; PARROT WA; FLINN BS. 1995. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis in plants. In: THORPE TA. (Ed.). *In vitro embryogenesis in plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers p. 155-203.
- MURASHIGE T; SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- MURASHIGE T. 1977. Plant Cell and organ cultures a horticultural practices. *Acta Horticulturae*, 78: 17-30.
- RAYMOND PC; CANTLIFFE DJ. 1988. Somatic embryony patterns and plant regeneration in *Ipomoea batatas* Poir. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 24: 955-958.
- RAYMOND PC; CANTLIFFE DJ. 1989. Composition of embryogenic suspension cultures of *Ipomoea batatas* Poir. and production of individualized embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ culture*, 17: 39-52.
- RAO PS. 1965. In vitro induction of embryonal proliferation in *Santalum album* L. *Phytomorphology*, 15: 175-179.
- TABEI Y; KANNO T; NISHIO T. 1991. Regulation of organogenesis and somatic embryogenesis by auxin in melon, *Cucumis melo* L. *Plant Cell Reports* 10: 225-229.
- VASIL IK. 1982. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cereals and grasses. In: FUJIWARA A (Ed.). *Plant tissue culture*. p. 101-103.
- WANG D; WERGIN WP; ZIMMERMAN H. 1984. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of strawberry. *HortScience*, 19: 71-72.
- ZIMMERMAN JL. 1993. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *Plant Cell*, 5: 1411-1423.