

RESGATE DE EMBRIÕES EM PESSEGUEIRO: TEMPO DE INCUBAÇÃO

OVULE RESCUE IN PEACHES: INCUBATION PERIOD

Maria do Carmo Bassols RASEIRA¹
Patrícia Milech EINHARDT²

RESUMO

O sucesso no desenvolvimento de plântulas, a partir de embriões imaturos tem sido obtido desde 1936. Entretanto, quanto menor é o embrião, mais complexo e difícil é alcançar a porcentagem desejável de sobrevivência. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o período de tempo que as sementes de clones muito precoces deveriam ficar em meio de cultura e à temperatura de 22 ± 1 °C, antes de serem submetidas à embriocultura. Também foi avaliado o efeito de se conservar as frutas em câmara fria, por uma semana, antes de ser feito o resgate de embriões. Os resultados indicam que o tempo para incubação dos mesmos, à temperatura de 22 ± 1 °C pode ser de até seis semanas, mas o melhor é entre três e quatro semanas. O fator limitante é a contaminação das sementes por patógenos. Também é possível obter sucesso com a técnica de resgate de embriões de frutas conservadas por uma semana em câmara fria, desde que o tempo de incubação não seja superior a três ou quatro semanas.

Palavras-chave: embriocultura; embriões imaturos; *Prunus persica*.

ABSTRACT

Success with immature embryos has been achieved since 1936. However, as smaller is the embryo more complex and difficult is to have a desirable survival percentage. The objective of this work was to check the period of time that seeds should be kept in the culture media at 22 ± 1 °C, before being submitted to the embryo culture procedure. The effect of keeping the fruits for a week in cold room, previously to the ovule rescue, was also evaluated. Results showed that the time for ovule incubation at 22 ± 1 °C, can be up to nine weeks but better three to five weeks. The limiting factor is related to seed contamination by pathogens. It is also possible to have success with ovule rescue of embryos of fruits kept for one week in cold room, as long as the time, the ovule incubation period, is not superior to three or four weeks.

Key-words: embryoculture; immature embryos; *Prunus persica*.

¹Dra. Pesquisadora Embrapa Clima Temperado. Rodovia BR 392, km 78, Caixa Postal 403, CEP 96001-970, Pelotas, RS, Brasil. E-mail: bassols@cpact.embrapa.br. Autora para correspondência.

²Extensionista da EMATER, Canguçu, RS, Brasil (a época estudante do Curso de Agronomia da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil. E-mail: patyeinhardt@gmail.com

INTRODUÇÃO

Sementes mostram baixa porcentagem de germinação por deficiências nutricionais e/ou razões fisiológicas. Em cultivares de frutas de caroço, de maturação precoce, a germinação normal das sementes é muito baixa. Este fato é atribuído a um pobre desenvolvimento do embrião. O embrião das plantas é uma estrutura multicelular, com o potencial de formar uma nova planta. Ainda que em condições normais, embriões jovens possam alcançar a maturidade e desenvolver seu potencial, há casos em que isto não acontece, e quando é importante desenvolver a planta a partir dos mesmos, ele pode ser "resgatado" do abortamento através de sua cultura em condições apropriadas (Sharmal et al., 1995). Em alguns casos, entretanto, não é tecnicamente possível remover o embrião do óvulo. Nestes casos se faz o resgate dos óvulos ou mesmo do ovário. Seria interessante uma distinção entre cultura de embriões e resgate de embriões. Este último é aplicado quando há perigo de abortamento do embrião, se o mesmo não for resgatado. Há, entretanto, quem use os dois termos como se fossem sinônimos (Sharmal et al., 1995).

O sucesso no cultivo de pequenos embriões já foi obtido em diversos gêneros, desde 1936 (Ramming, 1990). Desde então a técnica de cultura de embriões vem se expandindo e contribuindo significativamente com estudos básicos de fisiologia do desenvolvimento de embrião (Carvalho & Araújo, 2007). A má germinação das sementes de pessegueiros precoces tem explicação no processo de maturação do fruto, em que o rápido endurecimento do caroço restringe o acúmulo de matéria orgânica na semente e causa um desenvolvimento anormal do embrião, tornando-o pouco vigoroso e incapaz de germinar naturalmente (Barbosa et al., 1985).

A cultura de embriões, no programa de Melhoramento Genético de pessegueiro, para o desenvolvimento de cultivares de maturação precoce, se constitui, portanto, num processo indispensável (Carvalho et al., 2008). O sucesso no resgate de embriões depende do seu estágio de maturação, por ocasião da cultura, do meio e condições de cultivo (Ramming, 1990). Entretanto, quanto mais jovem for o embrião, mais complexa será a exigência nutricional que permita seu desenvolvimento (Ferreira & Hu, 1998).

De acordo com Mancuso et al. (2002), apesar desta técnica ter sido usada há muito tempo, o uso de genótipos diferentes faz com que sejam necessários ajustes ao protocolo.

O embrião em crescimento é um sistema dinâmico que mostra mudanças em suas necessidades durante o crescimento e desenvolvimento. Quanto menor for o embrião, mais complexo é o meio requisitado (Sharmal et al., 1996).

Durante o desenvolvimento do embrião imaturo em cultura *in vitro*, deve-se esperar

mudanças progressivas de suas necessidades nutricionais, o que, muitas vezes, significa transferir o embrião de um meio para outro, até a otimização do seu crescimento (Ferreira & Hu, 1998).

Por outro lado, como estas técnicas necessitam de laboratório e condições assépticas (incluindo câmaras de fluxo), isto onera o processo, além de exigir mão-de-obra especializada. Por isso, nem todos os programas de melhoramento dedicam-se a esta técnica.

Assim, não é raro que fruto produzido em um local, tenha de ser levado a outro para que se faça a extração das sementes e o cultivo dos embriões ou resgate de óvulos. Apesar de Anderson et al. (2006) enfatizarem a importância de se realizar a cultura de embrião imediatamente após a colheita das frutas, no presente trabalho buscou-se também verificar se seria possível conseguir sucesso na técnica, mesmo após conservar as frutas por uma semana, em câmara fria.

O presente trabalho apresenta resultados de três experimentos realizados com o objetivo de testar o tempo que os embriões deveriam ficar à temperatura de 22 ± 1 °C, para que se obtenha o melhor resultado, quando, posteriormente, for realizada a embriocultura. Foi também observado se uma semana dos frutos em câmara, a 4 ± 1 °C, após a colheita prejudicaria ou não o resgate de embriões.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos três experimentos com resgate de embriões, dois na safra 2007/2008 e um na safra 2008/2009.

Experimento 1

Frutos obtidos por polinização livre na safra 2007/2008 da seleção denominada Cascata 1171, foram colhidos, levados ao laboratório e tratados com álcool 70° e posteriormente, com solução de hipoclorito de sódio, para desinfestação. Em 60 frutas fez-se a extração das sementes, cortando-as (inclusive o endocarpo) na linha da sutura e retirando as sementes com uma pinça flambada. Em 20 frutas, este procedimento foi realizado uma semana depois de manter as frutas em câmara fria a 4 ± 1 °C.

Uma vez extraídas dos frutos, as sementes foram colocadas em tubos de ensaio contendo meio SH (Stewart & Hsu, 1977) + 6% de sacarose e 7% de ágar. Os tubos com as sementes foram então, colocados em câmara de crescimento à temperatura de 22 ± 1 °C.

Os tratamentos testados foram os seguintes:

T1 = 5 semanas, em câmara de crescimento, a temperatura entre 22 ± 1 °C;

T2 = 7 semanas, em câmara de crescimento, a temperatura entre 22 ± 1 °C;

T3 = 9 semanas, em câmara de crescimento, a temperatura entre 22 ± 1 °C;

T4 = Extração das sementes após uma semana de armazenamento das frutas em câmara fria (4 ± 1 °C), seguindo-se 4 semanas das sementes em tubos de ensaio em câmara de crescimento à temperatura entre 22 ± 1 °C;

O delineamento experimental foi completamente casualizado com quatro repetições sendo a parcela representada por cinco embriões.

Experimento 2

Neste experimento foram utilizadas sementes obtidas por polinização aberta na safra 2007/2008 das plantas de uma progênie resultante de cruzamento realizado em 2003, entre as cultivares Sunmist x 77 Espanha. Oitenta frutas foram desinfestadas e cortadas na linha de sutura para a extração das sementes e oitenta foram desinfestadas e colocadas em câmara fria para proceder-se a extração das sementes, uma semana depois. Em todos os casos, as sementes foram tratadas e colocadas em tubos de ensaio com meio de cultura SH.

O procedimento de desinfestação e o cuidado com as sementes foram idênticos ao experimento 1, entretanto os tratamentos foram diferentes.

T1 = As sementes, depois de colocadas em tubos com meio SH, ficaram por três semanas em câmara de crescimento, a temperatura entre 22 ± 1 °C;

T2 = As sementes, depois de colocadas em tubos com meio SH, ficaram por cinco semanas em câmara de crescimento, a temperatura entre 22 ± 1 °C;

T3 = As sementes, depois de colocadas em tubos com meio SH, ficaram por sete semanas em câmara de crescimento, a temperatura entre 22 ± 1 °C;

T4 = As sementes, depois de colocadas em tubos com meio SH, ficaram por nove semanas em câmara de crescimento, a temperatura entre 22 ± 1 °C;

T5 = Frutos uma semana na câmara fria; sementes três semanas na câmara de crescimento;

T6 = Frutos uma semana na câmara fria; sementes cinco semanas na câmara de crescimento;

T7 = Frutos uma semana na câmara fria; sementes sete semanas na câmara de crescimento;

T8 = Frutos uma semana na câmara fria; sementes nove semanas na câmara de crescimento;

O delineamento experimental foi também completamente casualizado, com quatro repetições e cinco sementes por parcela.

Experimento 3

Na safra 2008/2009, foram coletados frutos obtidos por polinização aberta da cultivar BRS Libra (Conserva 1125). As sementes foram extraídas e submetidas aos seguintes tratamentos:

T1 = Colocadas imediatamente em câmara de crescimento, a temperatura entre 22 ± 1 °C, por três semanas;

T2 = Colocadas imediatamente em câmara de crescimento, a temperatura entre 22 ± 1 °C, por quatro semanas;

T3 = Colocadas imediatamente em câmara de crescimento, a temperatura entre 22 ± 1 °C, por cinco semanas;

T4 = Colocadas imediatamente em câmara de crescimento, a temperatura entre 22 ± 1 °C, por seis semanas;

T5 = Colocadas imediatamente em câmara de crescimento, a temperatura entre 22 ± 1 °C, por sete semanas;

T6 = As frutas ficaram por uma semana em câmara fria, a 4 ± 1 °C, antes da extração das sementes, desinfecção e plantio em tubos de ensaio com meio de cultura SH, os quais foram colocados em câmara de crescimento, onde permaneceram por três semanas;

T7 = As frutas ficaram por uma semana em câmara fria, a 4 ± 1 °C, antes da extração das sementes, desinfecção e plantio em tubos de ensaio com meio de cultura SH, os quais foram colocados em câmara de crescimento, onde permaneceram por quatro semanas;

T8 = As frutas ficaram por uma semana em câmara fria, a 4 ± 1 °C, antes da extração das sementes, desinfecção e plantio em tubos de ensaio com meio de cultura SH, os quais foram colocados em câmara de crescimento, onde permaneceram por cinco semanas;

T9 = As frutas ficaram por uma semana em câmara fria, a 4 ± 1 °C, antes da extração das sementes, desinfecção e plantio em tubos de ensaio com meio de cultura SH, os quais foram colocados em câmara de crescimento, onde permaneceram por seis semanas;

T10 = As frutas ficaram por uma semana em câmara fria, a 4 ± 1 °C, antes da extração das sementes, desinfecção e plantio em tubos de ensaio com meio de cultura SH, os quais foram colocados em câmara de crescimento, onde permaneceram por sete semanas;

Neste experimento foram apenas conferidas notas ao aspecto do sistema radicular e da parte aérea, imediatamente antes do plantio em casa de vegetação.

A sobrevivência das plântulas não foi observada devido a um problema generalizado de morte de plântulas, mesmo nas não pertencentes ao experimento, atribuído ao substrato e irrigação excessiva, o que trouxe como consequência, baixa aeração das raízes.

O delineamento experimental foi completamente casualizado, com três repetições e dez sementes por parcela.

Para os três experimentos, decorrido o tempo em câmara de crescimento, de acordo com o tratamento, as sementes foram levadas à câmara de fluxo vertical, onde foram retirados os tegumentos, sob condições assépticas e transplantadas para tubos contendo meio WPM (Wood Plant Medium), de Lloyd & McCown (1980) + 2% de sacarose. Após a inoculação dos embriões com cotilédones no meio, eles foram submetidos à vernalização em câmara fria (4 ± 1 °C), por dois meses.

Completado este tempo, os tubos com as

sementes foram retirados da câmara fria e deixados à temperatura ambiente, por dois dias, após os quais, as sementes foram avaliadas quanto ao início de germinação, de acordo com a seguinte escala de notas: 0 - ausência de raiz e parte aérea; 1 - só apresentava parte aérea; 2 - apresentava apenas raiz; 3 - com raiz e parte aérea.

As sementes foram deixadas à temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C), durante 15 dias e posteriormente quanto ao sistema radicular e parte aérea, atribuindo-se notas conforme a escala abaixo:

Para o sistema radicular: 0 - sem nenhuma raiz; 1- menos de 5 raízes; 2 - de 5 a 10 raízes; 3 - de 11 a 20 raízes e 4 - mais de 21 raízes.

Para a parte aérea: 1 - embrião morto; 2 - branco ou verde, mas sem parte aérea; 3 - fraco ou com ponta seca; 4 - crescimento pouco vigoroso e 5 - crescimento normal, vigoroso.

Após esta avaliação, fez-se o plantio em casa de vegetação das plântulas em bandejas contendo solo virgem e areia, na proporção de 1/3.

Foi também avaliada a porcentagem de mudas sobreviventes nas sementeiras. Após 80

dias de plantio, estas foram contadas, para comparação com a quantidade de embriões inicialmente colocados nos tubos de ensaio.

Para a análise estatística, as notas atribuídas, conforme explicação anterior, foram transformados em log (x+1).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1

No primeiro experimento (Tabela 1), não houve diferença significativa entre os tratamentos, quanto ao início da germinação e ao aspecto do sistema radicular imediatamente antes do plantio em sementeiras, em casa de vegetação. Para a parte aérea, o melhor resultado foi obtido no tratamento em que as sementes (embrião + cotilédones e tegumento) permaneceram por nove semanas à temperatura entre 22 ±1 °C, mas este tratamento não diferiu do de cinco semanas. Entretanto, a porcentagem de sobrevivência – considerando o número de sementes inicial e o número de plântulas obtidas, 80 dias após o plantio, em sementeiras – foi muito baixa para este tratamento (nove semanas).

TABELA 1 - Avaliação do início de germinação, aspecto do sistema radicular e da parte aérea antes do plantio e porcentagem de sobrevivência de plântulas oriundas de polinização livre da seleção Cascata 1171, Pelotas, 2008.

Tratamento	Início da germinação ¹	Aspecto do sistema radicular ²	Aspecto da parte aérea ³	Sobrevivência (%)
T3	1,8 A	1 A	4,13 A	5,0
T2	1,43 A	1 A	3,5 A	10,0
T1	1,18 A	1,18 A	3,07 A B	40,3
T4	1,25 A	1 A	2,5 B	10,0
C.V.(%)	18,27	15,48	8,21	-

Valores seguidos de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ($\alpha = 5\%$).

C.V. = coeficiente de variação.

¹ Escala de Notas: 0 - ausência de raiz e parte aérea; 1 - só apresentava parte aérea; 2 - apresentava apenas raiz; 3 - com raiz e parte aérea.

² Escala de Notas: 0 - sem nenhuma raiz; 1- menos de 5 raízes; 2 - de 5 a 10 raízes; 3 - de 11 a 20 raízes e 4 - mais de 21 raízes.

³ Escala de Notas: 1 - embrião morto; 2 - branco ou verde, mas sem parte aérea; 3 - fraco ou com ponta seca; 4 - crescimento pouco vigoroso e 5 - crescimento normal, vigoroso.

Promchot & Boonprakob (2007), trabalhando com embriocultura, isto é, com remoção de tegumento imediatamente à assepsia das sementes, obtiveram alta porcentagem de germinação, mesmo no tratamento controle (WPM com agar a 0,4%), que teve 72%, mas a sobrevivência neste foi muito baixa. No tratamento em que foi utilizada vermiculita ao invés de agar com meio WPM, a germinação foi superior. Os autores atribuem à maior aeração nas radículas. Em média, os embriões testados tinham entre 0,5

cm a 1 cm de comprimento, o que coincide com os utilizados nesses trabalho.

Experimento 2

Na saída da câmara fria, final do período de estratificação, o melhor tratamento foi o T2 (5 semanas na incubadora), que não diferiu do T4 (1 semana câmara fria + 3 semanas na incubadora), T1(3 semanas na incubadora) e T5 (1 semana câmara fria + 5 semanas na incubadora) (Tabela 2).

TABELA 2 - Avaliação do início de germinação, aspecto do sistema radicular e da parte aérea antes do plantio e porcentagem de sobrevivência de plântulas oriundas de polinização livre de uma progênie resultante de cruzamento realizado em 2003, entre as cultivares Sunmist x 77 Espanha, Pelotas, 2008.

Tratamento	Início da germinação ¹	Aspecto do sistema radicular ²	Aspecto da parte aérea ³	Sobrevivência (%)
T2	2,42 A	2,28 A	4,78 A	35
T4	1,92 A B	1,67 A	4,17 A B	25
T1	1,83 A B	2,22 A	3,67 A B C	20
T5	1,58 A B	1,49 A	3,73 A B C	15
T3	1,23 B C	1,58 A	3,38 B C	10
T8	1,21 B C	1,41 A	3,00 B C	10
T7	0,71 C	1,58 A	4,00 A B	15
T6	0,75 C	1,42 A	2,00 C	15
C.V.(%)	27,34	25,66	9,95	-

Valores seguidos de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ($\alpha = 5\%$).

C.V. = coeficiente de variação.

¹ Escala de Notas: 0 - ausência de raiz e parte aérea; 1 - só apresentava parte aérea; 2 - apresentava apenas raiz; 3 - com raiz e parte aérea.

² Escala de Notas: 0 - sem nenhuma raiz; 1 - menos de 5 raízes; 2 - de 5 a 10 raízes; 3 - de 11 a 20 raízes e 4 - mais de 21 raízes.

³ Escala de Notas: 1 - embrião morto; 2 - branco ou verde, mas sem parte aérea; 3 - fraco ou com ponta seca; 4 - crescimento pouco vigoroso e 5 - crescimento normal, vigoroso.

Neste experimento, as diferenças quanto ao sistema radicular, medido imediatamente antes do plantio em sementeiras, não foi significativa. Em relação à parte aérea, o melhor resultado foi obtido com 5 semanas na incubadora, o qual não diferiu do T4 (1 semana câmara fria + 3 semanas na incubadora), T7 (9 semanas na BOD), T5 (1 semana câmara fria + 5 semanas na incubadora) e T1 (3 semanas na incubadora).

O índice de sobrevivência também foi mais alto no tratamento T2, seguido do T4 e T1.

Anderson et al. (2006) usaram resgate de embriões incubados a 25 °C por quatro semanas, e obtiveram sobrevivência superior a 60% quando o tempo entre a colheita das frutas e os procedimentos de resgate de embriões foi inferior a uma semana. Segundo estes autores o período de armazenamento das frutas tem um grande efeito sobre a formação das plântulas e sua sobrevivência, o que enfatiza a importância de se proceder as técnicas de resgate dos embriões imaturos imediatamente após a colheita. No presente trabalho, a técnica de resgate de embrião foi realizada logo e uma semana após a colheita, portanto, não foi possível confirmar o efeito para

armazenamento superior a este período.

Em testes anteriores, dados não apresentados, conduzidos na safra 2005/2006, não houve diferenças entre 3 ou 7 semanas na câmara de crescimento, e 5 semanas havia sido inferior quanto ao desenvolvimento inicial das plântulas, entretanto, não foi o que se verificou no presente ano. Mas deve ser salientado que nos testes de 2005, não foi observada a porcentagem final de sobrevivência.

Anderson et al. (2006), usaram resgate de óvulos a 25 °C por quatro semanas, e obtiveram sobrevivência superior a 55%.

Experimento 3

As diferenças obtidas entre tratamentos foram estatisticamente significativas (Tabela 3). Tanto para a parte aérea, quanto para as raízes, o melhor tratamento consistiu em deixar as frutas por uma semana em câmara fria e depois extrair as sementes, e estas após colocadas em meio SH, ficaram por 3 semanas em câmara de crescimento. Este tratamento, entretanto não diferiu do T7, T2 e T3 quanto ao sistema radicular e de T7, T2, T8, T3, T1 e T4 quanto a parte aérea.

TABELA 3 - Avaliação do aspecto do sistema radicular e da parte aérea antes do plantio de plântulas oriundas de polinização livre da cultivar BRS Libra (Conserva 1125), Pelotas, 2009.

Tratamento	Aspecto do sistema radicular ¹	Aspecto da parte aérea ²
T6	2,3 A	3,95 A
T7	1,79 A B	3,92 A B
T2	1,19 A B C	2,93 A B C
T3	1,11 A B C	2,71 A B C
T8	0,83 B C D	2,89 A B C
T10	0,89 B C D	2,45 B C
T1	0,74 B C D	2,62 A B C
T4	0,66 C D	2,54 A B C
T9	0,43 C D	1,79 C
T5	0,14 D	1,67 C

Valores seguidos de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ($\alpha = 5\%$)

¹ Escala de Notas: 0 - sem nenhuma raiz; 1 - menos de 5 raízes; 2 - de 5 a 10 raízes; 3 - de 11 a 20 raízes e 4 - mais de 21 raízes.

² Escala de Notas: 1 - embrião morto; 2 - branco ou verde, mas sem parte aérea; 3 - fraco ou com ponta seca; 4 - crescimento pouco vigoroso e 5 - crescimento normal, vigoroso.

O tempo de câmara fria testado foi de uma semana, assim, não se pode indicar períodos maiores de conservação das frutas antes do resgate de embriões, sem que sejam previamente testados.

CONCLUSÃO

Analisando os resultados obtidos nos três experimentos, conclui-se que os embriões podem

ficar por até 6 semanas, entre o tempo das frutas em câmara fria e das sementes em meio SH, em BOD, sem prejuízo ao desenvolvimento das plântulas e desde que tenha cuidado para evitar contaminação nas frutas e/ ou sementes.

Sobre o tempo de permanência das sementes em câmara fria antes de serem cultivadas *in vitro*, conclui-se que uma semana não prejudica o desenvolvimento e crescimento dos embriões, mas pelo contrário, favorece.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, N.; BYRNE, D. H.; RAMMING, D. W. In ovule culture success as affected by sugar source and fruit storage duration in Nectarine. *Acta Horticulturae*, n. 713, p. 89-92, 2006.
- BARBOSA, W.; DALL'ORTO, F. A. C.; OJIMA, M. Cultura de embriões *in vitro* para o melhoramento de pessegueiros precoces. *Bragantia*, v. 44, n. 1, p. 465-472, 1985.
- CARVALHO, A. S. et al. Cultivo *in vitro* de embriões de nectarineira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 20., 2008, Vitória-ES. **Frutas para todos: estratégias, tecnologias e visão sustentável**. Vitória, 2008. CD-Rom.
- CARVALHO, J. M. F. C.; ARAÚJO, S. de S. **Aplicação do cultivo de embrião zigótico ou imaturo no melhoramento vegetal**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2007. 35 p. (Embrapa Algodão. Documentos, 170).
- FERREIRA, A. G.; HU, C.Y. Cultura de embriões. 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. 371-393.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel *Kalenna latifolia*, by use of shoot-tip culture. *International Plant Propagators Society Combined Proceedings*, v. 30, p. 421-427, 1980.
- MANCUSO, M. L.; CARUSO, T.; GERMANA, M. A. Peach breeding program for earlyripening, low chill requirement cultivars: embryo rescue and somatic embryogenesis. *Acta Horticulturae*, n. 592, p. 125-129, 2002.
- RAMMING, D. W. The use of embryoculture in fruit breeding. *HortScience*, v. 25, n. 4, p. 393-398, 1990.
- PROMCHOT, S.; BOONPRAKOB, U. Replacing agar with vermiculite, coconut fiber and charcoal ricehusk in culture media for embryo rescue of immature nectarines seeds. *Thai Journal of Agricultural Science*, v. 40, n. 3-4, p. 167-173, 2007.
- SHARMA, D. R.; KAUR, R.; KUMAR, K. Embryo rescue in plants- a review. *Euphytica*, v. 89, n. 3, p. 325-337, 1996.
- STEWART, J. M.; HSU, C. L. In ovulo embryo culture and seedling development of cotton. *Gossypium hirsutum* L. *Planta*, v. 137, n. 2, p. 113-117, 1977.

Recebido em 29/04/2010

Aceito em 03/12/2010