



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE BACHARELADO E LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

ÁKYLA MARIA MARTINS ALVES

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E APLICAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA NIR NA
ANÁLISE PROTEÔMICA EM AMENDOIM**

CAMPINA GRANDE – PB
2012

ÁKYLA MARIA MARTINS ALVES

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E APLICAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA NIR NA
ANÁLISE PROTEÔMICA EM AMENDOIM**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do grau de graduação.

Comitê de Orientação:

Dra. Julita Maria Frota Chagas Carvalho

Dr. Everaldo Paulo de Medeiros

Dr. Humberto Silva

CAMPINA GRANDE – PB
2012

A474e

Alves, Ákyla Maria Martins.

Embriogênese somática e aplicação da espectroscopia nir na análise proteômica em amendoim [manuscrito] / Ákyla Maria Martins Alves. – 2012.

41 f. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biologia) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2012.

“Orientação: Profa. Dra. Julita Maria Frota Chagas Carvalho, Embrapa Algodão”

1. *Arachis hypogaea* L. 2. Plantas oleaginosas. 3. Sementes. I. Título.

21. ed. CDD 580


ÁKYLA MARIA MARTINS ALVES

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E APLICAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA NIR NA
ANÁLISE PROTEÔMICA EM AMENDOIM**

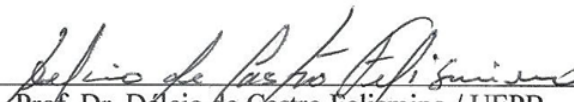
Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do grau de graduação.

Aprovada em 28/06/2012.

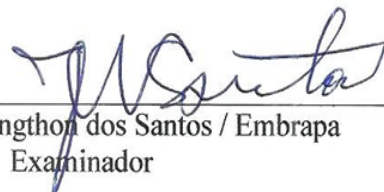
Banca Examinadora



DSc. Julita Maria Frota Chagas Carvalho
Orientadora/EMBRAPA-PB



Prof. Dr. Délcio de Castro Felismino / UEPB
Examinador



Ms. José Wellington dos Santos / Embrapa
Examinador

A toda minha família em especial aos meus pais adotivos Aduino “*in memoriam*” e Lindalva, minha mãe Silvana e meu namorado Paulo Canuto, pelo grande exemplo e pelo apoio em todos os momentos da minha vida.

Dedico!

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Deus, por minha vida, saúde e sabedoria.

A todos que fazem parte da Embrapa Algodão, em especial: aos meus orientadores Dra. Julita e Dr. Everaldo Paulo, pela oportunidade de realizar este trabalho e acima de tudo pela amizade, confiança e conselhos.

A todos que fazem ou fizeram parte do Laboratório de Cultivo de Tecidos: Seu Amaro, Flávia, Claudiane, Jéssica, Professor Humberto, Oton, Raissa, e em especial, a Dra. Julita, Dione Márcia, Raquel e Taíza, pela colaboração, boa convivência e principalmente a amizade que guardarei para sempre em meu coração.

A todos do Laboratório de Química (LATEQ), em especial Dr. Everaldo, Pollyne, Welma, Bethânia, Germana e Edjane, pelo apoio e colaboração na realização deste trabalho, e pelas conversas e amizade.

A banca examinadora pela participação, incentivo e sugestões que irão enriqueceram este trabalho.

Ao Dr. Wellington dos Santos, pelas orientações às quais foram muito importantes para realização deste trabalho, e minha formação, e a Ivanilda pelo apoio sempre que precisei.

A todos que fazem parte da UEPB, em especial a coordenação do curso e todos os professores do curso de Ciências Biológicas da UEPB, que contribuíram ao longo de quatro anos, por meio das disciplinas e debates essenciais para minha formação.

Ao professor Mathias Weller, por um ano de iniciação científica, que foi muito importante para minha formação, a Márcia Adelino, pelos conselhos e a professor Humberto Silva pela supervisão no estágio supervisionado.

A turma biologia 2008.2, pelos momentos de amizade e apoio.

As minhas amigas, Raissa, Gabriela, Bianca, Vanessa e Allane, por sempre estarem dispostas a me ajudar quando eu precisei, e pelos momentos divertidos que passamos.

Ao CNPq, pela bolsa de Iniciação Científica concedida para realização deste trabalho.

E aos demais que de alguma forma contribuíram para esta conquista. Obrigada!

“Sem malícia, aprendi a sabedoria, e agora a distribuo sem inveja nenhuma. Não vou esconder sua riqueza, porque ela é um tesouro inesgotável para os homens.” “A sabedoria educa os seus filhos, e cuida daqueles que a procuram. Quem tem amor a ela ama a vida, e os que madrugam para procurá-la ficarão cheios de alegria. Quem a possui terá como herança a honra, e onde quer que vá, o senhor o abençoará”.

(Sb. 7, 13-14; Ecl. 4, 11-13).

RESUMO

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) pertencente à família Leguminosae é uma das oleaginosas subtropicais mais cultivadas no mundo. A sua importância econômica está relacionada ao fato de suas sementes poderem ser utilizadas diretamente na alimentação humana, nas indústrias de conservantes, confeitarias, oleoquímica e no biodiesel. Mediante sua importância, o cultivo de tecidos *in vitro* torna-se uma técnica importante, visto que seleciona plantas saudáveis e geneticamente superiores. Uma alternativa *in vitro*, é a multiplicação de plantas via embriogênese somática, cuja principal vantagem é a possibilidade de armazenamento dos propágulos por um longo prazo através da criopreservação. No entanto, essa técnica necessita de protocolos bem estabelecidos e de investigações acerca do controle de variáveis determinadas por fatores genéticos, estado fisiológico do explante e pelo efeito do meio sobre fatores endógenos. Nesse caso, o uso da espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) poderá emergir como uma importante ferramenta para estudos acerca desse processo, pois permite realizar análises de forma não destrutiva, num curto período e sem uso de reagentes. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi induzir a embriogênese somática e caracterizar perfis proteicos de sementes, embriões zigóticos (EZ) e embriões somáticos (ES) de amendoim através da espectroscopia NIR. Para indução da embriogênese somática foi utilizado o meio MS (MURASHIGE e SKOOG) suplementado com vitaminas do meio B5, sacarose, gelrite e diferentes concentrações do 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). As culturas foram transferidas para sala de crescimento onde permaneceram no escuro e com temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. Após 30 dias observou-se o número de ES por explantes. As medidas de reflectância foram realizadas de maneira não destrutiva com espectrômetro VIS-NIR modelo XDS Analyser na região de 400 a 2500 nm. Os espectros foram avaliados por análise de componentes principais (PCA) na região de 1100 a 2500 nm e nas regiões de 1300 a 2300 nm que são atribuídas a presença de ligações N-H nas proteínas. Os resultados do número médio de ES foram transformados em $\sqrt{x+1}$, e submetidos à análise de variância e de regressão polinomial. O padrão de comportamento ajustou-se em um modelo polinomial quadrático, obtendo-se a concentração máxima de $34,4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ do 2,4-D para produzir em média 2,14 ES. A variância explicada na análise de PC1 x PC2 foi de 98%, com separação dos escores das amostras de sementes, dos EZ e ES provenientes dos tratamentos com 2,4-D, enquanto que a variância nas regiões de 1300 a 2300 nm foi de 99%. Quando comparado os EZ, explantes com e sem ES, a variância na análise de PC1 x PC2 e nas regiões atribuídas a proteínas em ambos foi de 98%. Dessa forma, a representação gráfica dos escores possibilitou a análise proteômica em sementes, EZ e ES de amendoim, e a estratégia desenvolvida permitiu reduzir o tempo das observações sem destruir as amostras.

PALAVRAS-CHAVE: *Arachis hypogaea* L. Cultura de Tecidos. Proteínas. 2,4- Diclorofenoxiacético.

ABSTRACT

The peanut (*Arachis hypogaea* L.) belonging to the family Leguminosae, is one of the oilseed subtropical most widely cultivated around the world. Its economic importance is related to the fact that their seeds can be used directly for human consumption, in the industry of preservative, bakeries, oleochemical and biodiesel. Through its importance, the *in vitro* tissue culture become an important technique, select healthy plants and genetically superior. An alternative *in vitro* is the multiplication of plants by somatic embryogenesis, whose main advantage is the possibility of storing the embryos over a long period by cryopreservation. However, this technique requires well-established protocols and research about the control of variables determined by genetic factors, through the physiological state of the explant and by the effect of environment on the endogenous. In this case, the use of Near Infrared Spectroscopy may emerge as an important tool for studies on this process, because it allows for analysis of non-destructive way, in a short time and without the use of reagents. Thus, the aim of this work was to induce somatic embryogenesis and characterize protein profiles of seeds, zygotic embryos (ZE) and somatic embryos (SE) of peanuts by NIR spectroscopy. For induction of somatic embryogenesis was used the culture medium MS (MURASHIGE e SKOOG) supplemented with vitamin B5, sucrose, gelrite and different concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). The cultures were transferred to growth room where they remained in the dark and with a temperature of 25 ± 2 °C. After 30 days of cultivation, we observed the numbers of SE for explant. The reflectance measurements were performed in a non destructive spectrometer VIS-NIR model XDS Analyser in the region 400-2500 nm. The spectra were evaluated by principal component analysis (PCA) in the region from 1100 to 2500 nm and regions from 1300 to 2300 nm that are attributed to the presence of bonds N-H in proteins. The results of the average number of the system were converted into $\sqrt{x+1}$, and subject to analysis of variance and regression polynomial. The behavior pattern set into a quadratic polynomial model to yield the maximum concentration of 34,4 mg.L⁻¹ of 2,4-D to produce an average 2,14 SE. The variance applied in the PCA analysis was 98% with separation of the scores of the seed samples of ZE and SE from the treatment with 2,4-D, while the variance in the regions 1300-2300 nm was 99%. When compared, the ZE explants, with and without SE, the variance in the PCA analysis and in the region of protein was of the 98%. Thus, the graphical representation of the scores, allowed the proteomic analysis of seed, ES and ZE of peanut and also the strategy developed reduced the time of observation, without destroying the samples.

KEYWORDS: *Arachis hypogaea* L. Tissue Culture. Protein. 2,4-Dichlorophenoxyacetic.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	Concentrações do 2,4-D utilizadas.....	21
TABELA 2 –	Resumo da análise de variância referente ao número de embriões somáticos em amendoim 30 dias após o cultivo em meio MS suplementado com diferentes concentrações do 2,4-D.....	25
TABELA 3 –	Valores médios referentes à variável número de embriões somáticos em amendoim, 30 dias após o cultivo em meio MS suplementado com diferentes concentrações do 2,4-D.....	26

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Características morfológicas da planta do amendoim, cultivar BR-1.....	14
FIGURA 2	Espectro eletromagnético.....	18
FIGURA 3	Análise dos perfis proteicos e de componentes principais no NIR.....	23
FIGURA 4	Efeito concentrações do 2,4-D, no número de ES de amendoim.....	26
FIGURA 5	Embriogênese somática em amendoim	27
FIGURA 6	Desenvolvimento das plântulas provenientes da ES em amendoim.....	28
FIGURA 7	Espectros de reflectância no NIR (400 a 2500 nm), obtidos da análise de sementes, embriões zigóticos e embriões somáticos de amendoim provenientes do meio MS suplementado com diferentes concentrações do 2,4-D, 30 dias após o cultivo.....	28
FIGURA 8	Espectros derivativos (na região de 400 a 2500 nm) obtidos do pré-processamento dos dados das amostras de sementes, embriões zigóticos e embriões somáticos de amendoim provenientes do meio MS suplementado com diferentes concentrações do 2,4-D, 30 dias após o cultivo.....	29
FIGURA 9	Escores do PC1 x PC2 (na região 1100 a 2500) aplicado ao conjunto das amostras de sementes, embriões zigóticos e embriões somáticos de amendoim provenientes do meio MS suplementado com diferentes concentrações do 2,4-D, 30 dias após o cultivo.....	29
FIGURA 10	Escores do PC1 x PC2 (na região de 1300 a 1500 nm e 2100 a 2300 nm) aplicado ao conjunto das amostras de sementes, embriões zigóticos e embriões somáticos de amendoim provenientes do meio MS suplementado com diferentes concentrações do 2,4-D, 30 dias após o cultivo.....	30
FIGURA 11	Espectros de reflectância no NIR (400 a 2500 nm), obtidos da análise de embriões zigóticos de amendoim antes e após indução em meio MS sem regulador de crescimento, e de embriões somáticos provenientes de meio MS suplementado com 30 mg.L ⁻¹ do 2,4-D aos 30, 40 e 50 dias de cultivo.....	30
FIGURA 12	Espectros derivativos (na região de 400 a 2500 nm) obtidos do pré-processamento dos dados das amostras de embriões zigóticos de amendoim antes e após indução em meio MS sem regulador de crescimento, e de embriões somáticos provenientes de meio MS suplementado com 30 mg.L ⁻¹ do 2,4-D aos 30, 40 e 50 dias de cultivo.....	31
FIGURA 13	Escores do PC1 x PC2 (na região 1100 a 2500) aplicado ao conjunto das amostras de embriões zigóticos de amendoim antes e após indução em meio MS sem regulador de crescimento, e de embriões somáticos provenientes de meio MS suplementado com 30 mg.L ⁻¹ do 2,4-D aos 30, 40 e 50 dias de cultivo.....	31
FIGURA 14	Escores do PC1 x PC2 (na região de 1300 a 1500 nm e 2100 a 2300 nm) aplicado ao conjunto das amostras de embriões zigóticos de amendoim antes e após indução em meio MS sem regulador de crescimento, e de embriões somáticos provenientes de meio MS suplementado com 30 mg.L ⁻¹ do 2,4-D aos 30, 40 e 50 dias de cultivo.....	32

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
2.	OBJETIVOS	13
1.2	<i>Geral</i>	13
1.2.1	<i>Específicos</i>	13
3.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
3.1	<i>O amendoim</i>	14
3.2	<i>Cultura de tecidos vegetais</i>	15
3.3	<i>Embriogênese somática</i>	16
3.4	<i>Análise proteômica</i>	17
3.5	<i>Espectroscopia no infravermelho próximo</i>	18
3.6	<i>Quimiometria</i>	19
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1	<i>Local e período de realização da pesquisa</i>	21
4.2	<i>Material vegetal e assepsia</i>	21
4.3	<i>Meio de cultura e indução da embriogênese somática</i>	21
4.4	<i>Regeneração</i>	22
4.5	<i>Aclimatização e transplante para casa de vegetação</i>	22
4.6	<i>Aplicações da espectroscopia NIR</i>	22
4.7	<i>Análises estatísticas</i>	23
4.7.1	<i>Embriogênese somática</i>	23
4.7.2	<i>Quimiometria</i>	24
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	25
6.	CONCLUSÕES	34
	REFERÊNCIAS	35

1. INTRODUÇÃO

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) pertencente à família Leguminosae, é uma oleaginosa originária da América do Sul, e cultivada nas mais variadas regiões tropicais do mundo pela sua adaptabilidade a uma grande diversidade de ambientes (MORAES, 2006). Estima-se que a semente de amendoim possui 50% de teor de óleo, e 22 a 30% de proteínas em sua composição, além disso, há presença de sais minerais, vitaminas e carboidratos, o que representa sua importância na alimentação humana (FREIRE et al., 1998; SANTOS et al., 2010).

O cultivo dessa oleaginosa segundo Beltrão et al. (2011) vem se tornando uma importante alternativa para a agricultura familiar no nordeste devido o seu ciclo reduzido, sua capacidade de produzir com baixo índice pluviométrico, e a possibilidade de ser cultivada em consórcio com outras culturas. Estas características justificam a importância do desenvolvimento de pesquisas que visem principalmente, o desenvolvimento de variedades com maior capacidade adaptativa.

É neste enfoque que o cultivo *in vitro* de plantas torna-se importante, visto que é uma ferramenta que possibilita a clonagem de plantas saudáveis e geneticamente superiores em escala comercial, além de colaborar na realização de estudos de transformação genética e conservação de espécies vegetais. Permite ainda aperfeiçoar a interação entre fatores genéticos e hormonais, associados à nutrição, luminosidade e temperatura, resultando em plantas com características almejadas (ALVES et al., 2008). Uma alternativa *in vitro*, é a multiplicação de plantas via embriogênese somática. Essa técnica é extremamente importante em programas de propagação, porém, para que seja viável é necessário que protocolos sejam bem estabelecidos (JIMÉNEZ, 2005; PAIS, 2003).

Segundo Jiménez (2005) e Pais (2003) as mudanças em nível celular causadas por qualquer tipo de estresse, como choque hormonal, cortes, escuridão, déficit nutricional ou choque térmico, são conhecidas como indutores de embriogênese. No entanto, poucos estudos acerca de sua aplicação para o amendoim foram realizados, e no geral pouco se sabe sobre o significado dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento de embriões somáticos até a regeneração da plântula.

Como alternativa de viabilizar os estudos em nível molecular da cultura de tecidos de plantas, a proteômica comparativa torna-se importante, pois, o proteoma reflete o conjunto de proteínas expressas num organismo em determinada situação, e ao contrário do genoma, não é

estático e pode se modificar dependendo das condições e estímulos que o organismo está exposto (DIAS, et al., 2000; SILVA et al. 2007). Estudos recentes tem analisado a expressão proteica durante a embriogênese somática, e apresentaram relatos de alterações nos perfis proteicos em resposta a diferentes meios de cultura (MORAES, 2006). Vários genes que influenciam a embriogênese somática foram agrupados em função de suas características em comum, dentre eles estão os de proteínas de choque térmico (heat shock proteins) e pJCW1 e 2, todos induzíveis por auxinas (CHUGH; KHURANA, 2002).

Nos projetos de proteoma, um dos objetivos primários é separar e visualizar o máximo de proteínas possível de uma fonte, permitindo que sejam catalogadas computacionalmente e estudadas por técnicas analíticas (SOUSA; FONTES; RICART et al., 2007). No entanto, até que seja possível chegar a estas etapas, é necessário que ferramentas sejam associadas para possibilitar a caracterização mais detalhada do material orgânico.

Dentre essas técnicas analíticas, de acordo com Montes et al. (2007) a espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) e a espectrometria de massa (MS/MS) emergem nas pesquisas bioquímicas, principalmente para realizar a medida de componentes principais, em regiões específicas, como as de proteínas. Poderá emergir também, como uma importante ferramenta para análise de processos biológicos, tais como a embriogênese somática, pois é possível realizar as análises de forma não destrutiva, e assim reduzir o número de ensaios sem a necessidade do uso de reagentes, e assim permitir a conservação das amostras para uso posterior.

2. OBJETIVOS

Geral

- Induzir a embriogênese somática a partir de embrião zigótico e caracterizar perfis proteicos de sementes, embriões zigóticos e somáticos de amendoim através da espectroscopia NIR.

Específicos

- Observar o efeito do 2,4-D na indução de embriões somáticos em amendoim;
- Comparar por meio dos espectros, os perfis proteicos dos embriões somáticos de amendoim provenientes de diferentes concentrações do 2,4-D, com embriões zigóticos e sementes;
- Analisar os perfis proteicos de embriões zigóticos e sementes, com embriões somáticos provenientes de explantes cultivados em meio de cultura, na presença e na ausência de 2,4-D;
- Relacionar os espectros na região do infravermelho próximo com o perfil diferencial de proteínas em embriões somáticos.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 O amendoim

O amendoim (*Arachis hypogaeae* L.) (Figura 1A) é uma dicotiledônea herbácea, anual, pubescente, de porte ereto ou rasteiro, pertencente à família Leguminosae. Nativo da América do Sul é uma das oleaginosas subtropicais mais cultivadas no mundo (BELTRÃO, 2011; DANTAS, 1999).

A espécie tem um processo especial de frutificação denominado geocarpia, em que uma flor aérea após ser fecundada, produz frutos subterrâneos (1B). Suas flores são amarelas, agrupadas em número variável ao longo do ramo principal ou também dos ramos secundários, e as sementes (Figura 1C) variam quanto à coloração e ao tamanho dentro de cada grupo (BELTRÃO, 2011; DANTAS, 1999).



Figura 1. Características morfológicas da planta do amendoim, cultivar BR-1: (A) Planta, (B) frutificação e (C) sementes.
Foto: Á. M. M. Alves. Campina Grande, 2012.

A importância econômica do amendoim segundo Bulgarelli (2008) e Graciano (2009) está relacionada ao fato de suas sementes poderem ser utilizadas diretamente na alimentação humana, nas indústrias de enlatados, confeitarias, oleoquímica e no biodiesel, além disso, o farelo obtido após a extração de óleo é utilizado na alimentação animal.

A China, Índia e Estados Unidos são os países em que a produção de amendoim se destaca. No Brasil a produção concentra-se na região Sudeste, enquanto no Nordeste, é cultivado basicamente por pequenos e médios produtores, no entanto, devido o incentivo da produção de óleo para o biodiesel a cultura se encontra em larga expansão (BELTRÃO, 2011; GRACIANO, 2009).

O amendoim pode ser cultivado em vários ambientes, contudo, o maior rendimento será em função das interações entre temperatura, disponibilidade hídrica e as características da cultivar (BOLONHEZI et al., 2005). A cultivar BR-1, por exemplo, obtida pela Embrapa Algodão em 1994, a partir dos genótipos CNPA 95 AM, CNPA 96 AM e Sapé Roxo, está

entre as cultivares aptas para produção e comercialização no País, pois, além de ser precoce e produtiva, é altamente adaptada ao Nordeste brasileiro (SANTOS et al., 2005).

3.2 Cultura de tecidos vegetais

A cultura de tecidos ou o cultivo *in vitro* de plantas, é uma técnica que visa à obtenção de uma nova planta a partir de fragmentos de tecido cultivado em um ambiente estéril e controlado. O princípio básico deste processo é a totipotencialidade das células, ou seja, qualquer parte da planta, a qual é chamada explante, contém toda a informação necessária para regeneração de uma planta completa (ALMEIDA, 2007; CARVALHO; VIDAL, 2003; PAIS, 2003; RAVEN et al., 2001).

Na cultura *in vitro*, a regeneração de plantas pode ocorrer por organogênese ou morfogênese. O primeiro processo envolve várias etapas das quais se deve assimilar a formação de meristemas caulinares, multiplicação e desenvolvimento e, após, enraizamento e aclimatização. Já a morfogênese, embriogênese somática ou gamética e formação de nódulos, engloba a indução e multiplicação das células competentes, originando embriões organogênicos (PAIS, 2003).

De acordo com Lemos (2003) as vantagens dessas técnicas, são a micropropagação em massa, multiplicação rápida de genótipos superiores, limpeza clonal, produção de sementes artificiais, clonagem de genes, conservação e intercâmbio de germoplasma.

No entanto, a capacidade de desenvolvimento organizado em plantas, depende da escolha do explante, do meio de cultura e do controle do ambiente físico (PAIS, 2003). Entre os meios de cultura, se destaca o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), desenvolvido a partir de testes de suplementação do meio de White com extratos de folha de fumo, hoje ele utilizado na cultura de diversas espécies (CALDAS; PADMAJA; FERREIRA et al., 1998).

Os meios de cultura são geralmente compostos por macronutrientes (nitrogênio, potássio, ferro, cálcio, fósforo e magnésio), micronutrientes (cobre, zinco, cloro, iodo, cobalto, níquel, alumínio, boro, manganês, molibdênio), suplemento de ferro, vitaminas (biotina, tiamina, mio-inositol), água e fontes de carbono (glicose, sacarose, açúcar) (BARRUETO CID, 2010; GOLLE, 2010).

Quando necessário, poderá ser adicionado ao meio os reguladores de crescimento e/ou geleificantes como o ágar (polissacarídeo extraído de algas marinhas) e o phytigel (gomas produzidas por certas bactérias). Os principais reguladores de crescimento utilizados são

auxinas, frequentemente usadas na indução de calos e no enraizamento; as citocininas, que são promotoras da divisão celular; e as giberelinas, responsáveis, principalmente, pelo alongamento de caules (BARRUETO CID, 2010; GOLLE, 2010; MATSUMOTO, 2000).

Quanto à cultura *in vitro* de espécies oleaginosas, entre elas o amendoim, trabalhos vêm sendo realizados com o objetivo de otimizar protocolos de organogênese e morfogênese (CARVALHO, et al., 2008; OZIAS-AKINS, et al., 1992; RIBEIRO, et al., 2010). Na Embrapa Algodão, Furtado et al. (2003) induziram o superbrotamento de amendoim, cultivar BR-1, e observaram a regeneração de plântulas, determinado assim, o melhor meio nutritivo para estes processos na espécie.

3.3 Embriogênese somática

A embriogênese somática é um tipo particular de regeneração de plantas a partir de células ou estruturas somáticas, tais como: embriões imaturos ou maduros, explantes de diferentes órgãos da planta, protoplastos e células em suspensão. Estes explantes, após tratamento adequado e seleção de um meio de cultura apropriado, originam estruturas idênticas a embriões gaméticos, passando por fases idênticas de globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (PAIS, 2003; SANTOS, 2010).

Segundo Zimmermann (2010), o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é o principal e mais eficiente regulador de crescimento a ser adicionado no meio de cultura como indutor de embriogênese somática. Ressalta-se ainda a importância de citocininas, como a 6-benzilaminopurina e thidiazuron, combinadas ou seguidas com auxinas.

Em se tratando da aquisição de competência embriogênica, de acordo com Pais (2003) ela está relacionada com o estabelecimento de gradientes iônicos e a deposição de calose e cutina em torno de células específicas que, na sequência de um estresse, são induzidas embriogênicamente. Dessa forma, independentemente dos fatores que regulam a expressão de competência, a embriogênese somática poderá ser direta, quando os embriões obtidos se formam diretamente a partir do explante utilizado sem passar pela fase de calogênese, ou indireta, quando a partir do explante inicial se forma um calo, onde algumas células são induzidas embriogênicamente.

São inúmeras as espécies em que foi possível induzir embriogênese somática, no entanto, apesar dos registros de alguns avanços no conhecimento sobre os fatores responsáveis pelo processo embriogênico, pouco se conhece sobre aquisição de competência (PAIS, 2003). Sabe-se por sua vez que na maioria das espécies vegetais estudadas, esse

processo depende da capacidade de a célula reprogramar a sua expressão gênica para então assumirem diferentes mudanças estruturais semelhantes aos embriões zigóticos, em meios de cultivo sob as condições *in vitro* (ZIMMERMANN, 2010).

Sendo assim, segundo Carvalho e Vidal (2003) e Pais (2003) a obtenção de protocolo para multiplicação do amendoim por embriogênese somática irá contribuir com estudos sobre a aquisição de competência embriogênica na espécie, e, além disso, possibilitará viabilização dos processos de transformação e recuperação dos acessos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG), e o armazenamento de propágulos por um longo prazo através da criopreservação

Guerra et al. (1999) e Hogberg et al. (1998) mencionam ainda que a partir das técnicas de embriogênese somática é possível obter uma grande quantidade de propágulos de forma sincronizada. Além disso, há possibilidade de um alto grau de automatização do sistema, permitindo baixar o custo efetivo da produção em larga escala de plântulas por embriogênese somática. É possível também utilizar as culturas para o isolamento e fusão de protoplastos.

3.4 Análise proteômica

O proteoma refere-se ao conjunto de proteínas expressas pelo genoma de um organismo num dado momento ou condição (DIAS, 2000; LANÇAS, et al., 2003). Neste contexto, a proteômica é uma área da ciência que tem como objetivo a identificação de diferenças quantitativas e qualitativas do proteoma de tecidos ou células (BISCH, 2004). De acordo com Lanças et al., (2003) o primeiro desafio do projeto proteoma é identificar todas as proteínas que atuam em uma célula, tecido ou órgão no estado normal, e depois suas variações em diferentes situações fisiológicas ou patológicas.

Na literatura são encontrados estudos proteômicos das espécies vegetais, tais como *Ocotea catharinensis* MEZ. (DIAS et al., 2010), *Arabidopsis thaliana* L. (BAGINSKY; GRUISSEM, 2006), *Theobroma cacao* L. (ARGOUT, et al., 2011) e *Mangifera indica* L. (ANDRADE, 2011). Estas pesquisas têm demonstrado grande importância para viabilizar a cultura de tecidos de plantas, principalmente no estudo e controle dos processos de embriogênese somática.

Em geral, os trabalhos em proteômica em plantas utiliza principalmente a eletroforese bidimensional (2-DE) em gel de poliacrilamida e a espectrometria de massa (MS/MS). No entanto, a análise por cromatografia líquida combinada com a MS/MS emerge como promissora nas pesquisas atuais (BISCH, 2004). Outras ferramentas analíticas também são mencionadas na literatura como promissoras na análise de proteoma, sementes, embriões

somáticos e células individuais, tais como: Infravermelho por transformada de Fourier (YANG; YEN, 2002; WOLKERS, et al., 1999), microespectroscopia no infravermelho próximo, microespectroscopia de fluorescência e Ressonância Magnética Nuclear (BAIANU, et al., 2003) e espectroscopia no infravermelho próximo (BAIANU, et al., 2011; JUN GUO; PRISECARU 2011).

Apesar dos avanços das técnicas e ferramentas analíticas para análise proteômica, de acordo com Salvato e Carvalho (2010) ainda é necessário um controle experimental rígido, e uma visão ampla para associar resultados à bioinformática e a estatística. Assim, a proteômica pode expandir uma gama de informações biológicas, permitindo entender aspectos fundamentais da biologia de plantas e, gerar no futuro um evidente impacto nas práticas agronômicas.

3.5 Espectroscopia no infravermelho próximo

A espectroscopia é a ciência que estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria, permitindo a obtenção de informações sobre o seu comportamento microscópico (BRUICE, 2006; SKOOG, et al., 2007).

De acordo com SKOOG, et al. (2007) os métodos espectroscópicos são classificados de acordo com a região do espectro eletromagnético (Figura 1) envolvida na medida, incluindo os raios γ , os raios χ , ultravioleta (UV), visível, infravermelha, micro-ondas e radiofrequência.

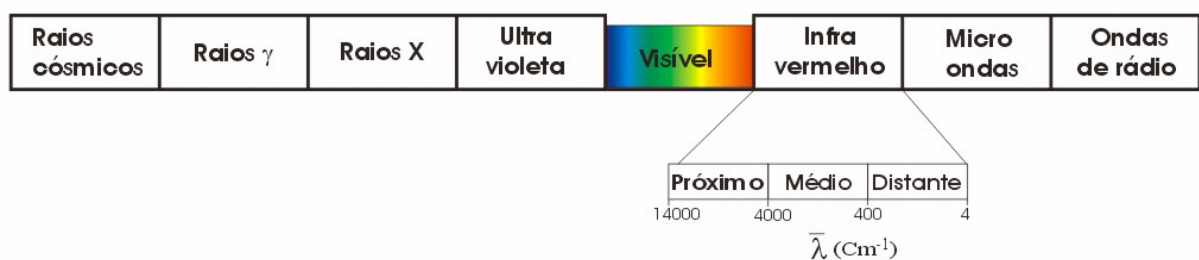


Figura 2. Espectro eletromagnético.
Fonte: Souza, N. R. Ilha Solteira, SP, 2005.

A região espectral do infravermelho próximo (NIR, do inglês near infrared) estende-se desde o final da região visível de maior comprimento de onda em cerca de 770 nm até 2500 nm (13.000 a 4000 cm^{-1}). As bandas de absorção nesta região são sobretons ou combinações de vibrações fundamentais de estiramento que ocorrem na região de 3000 a 1700 cm^{-1} . As ligações envolvidas geralmente são C–H, N–H e O–H (HOLLER, 2009).

Os mais importantes usos do NIR são em determinações quantitativas, de umidade, proteínas, hidrocarbonetos de baixa massa molar, gorduras, celulose e amido em produtos de indústrias agrícolas, alimentícias, petrolíferas e químicas (VOGEL, 2002; HOLLER, 2009).

Dentre as vantagens dessa técnica pode-se citar: permite a análise não destrutiva das amostras, o que é importante, pois quanto mais tratamento a amostra sofrer, antes de obter uma resposta final, maior será a introdução de erros na análise; possui sistemas óticos facilmente disponíveis, detectores eficientes, simplicidade relativa na instrumentação, e o fato de quase todos os compostos orgânicos absorvem nesta região; além da habilidade de extrair informações quantitativas, quimicamente significativas, via uso de técnicas estatísticas multivariadas (CAMOLESI, 2009).

3.6 *Quimiometria*

A quimiometria é definida como uma disciplina que utiliza métodos matemáticos e estatísticos para extrair o máximo de informações relevantes de dados químicos de natureza multivariada, obtidos a partir de diferentes técnicas instrumentais (FERREIRA et al., 1999; PEREIRA, 2007). Segundo Costa Filho et al. (2002) a quimiometria pode ser considerada como uma das principais contribuições para a difusão da espectroscopia NIR como uma poderosa ferramenta de análise qualitativas e quantitativas.

No entanto, de acordo com Brereton et al. (2003) e Dantas et al. (2010) antes de qualquer manipulação quimiométrica, é necessário realizar um pré-processamento nos dados, com o objetivo de remover ou reduzir variações aleatórias e sistemáticas, desvios na linha de base e ruídos instrumentais, a fim de preparar os dados para aplicações de técnicas de modelagem quimiométrica.

Os métodos quimiométricos podem ser agrupados nas três classes a seguir:

- Planejamento e otimização experimental;
- Desenvolvimento de modelos de calibração multivariada;
- Construção de modelos de análise exploratória, reconhecimento de padrão (RP) e classificação.

Entre as técnicas de RP, a Análise de Componentes Principais (PCA) é utilizada para examinar similaridades ou diferenças entre amostras, bem como para identificar a formação de padrões no espaço multidimensional (DANTAS, 2010).

A PCA consiste na manipulação matemática da matriz de dados para representar as diferenças presentes em muitas variáveis através de um número menor de fatores, preservando o máximo de informação (CORREIA et al, 2007; DANTAS, 2010). Isso é possível pela combinação linear das variáveis originais, constituindo um novo sistema de eixos ortogonais entre si, denominados componentes principais (PC), fatores ou variáveis latentes (FERREIRA et al, 1999).

As coordenadas das amostras no novo sistema de eixos dos PC's são chamadas de escores, e a contribuição que cada variável original exerce sobre determinado PC é denominada peso (*loading*), que pode ser definida como o cosseno do ângulo entre o eixo da variável e o eixo da PC (FERREIRA et al, 1999; DANTAS, 2010).

Assim, cada amostra passa a ser representada por um ponto no espaço multidimensional, do qual é possível extrair informações sobre a mesma e sobre agrupamentos ou classes que apresentem características semelhantes (DANTAS, 2010; NASCIMENTO, 2008).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local e período de realização da pesquisa

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Cultivo de Tecidos e Laboratório Avançado de Tecnologia Química (LATEQ) da Embrapa Algodão, em Campina Grande, PB, no período de agosto de 2011 a junho de 2012.

4.2 Material vegetal e assepsia

Foram utilizadas sementes de amendoim (cultivar BR-1) provenientes do município de Paudalho, Pernambuco. Foram considerados como fonte de explantes embriões zigóticos, os quais foram separados das sementes e desinfestados em solução de hipoclorito de sódio, a 0,25% de cloro ativo, adicionada com duas gotas de tween-20 para cada 100 mL de solução. Para retirar o excesso da solução as sementes foram lavadas três vezes em água destilada esterilizada.

4.3 Meio de cultura e indução da embriogênese somática

Na câmara de fluxo laminar e com o auxílio de instrumentos cirúrgicos previamente esterilizados, os explantes foram induzidos em placas de Petri contendo meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com vitamina do meio B5 (GAMBORG; MILLER; OJIMA, 1968) e 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) conforme os tratamentos (Tabela 1). Foi adicionado ao meio 3% de sacarose, 0,25% de gelrite, e o pH foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem, a 120°C durante 20 minutos. Após a indução os explantes foram transferidos para sala de crescimento e mantidos no escuro a 25±2°C.

Tabela 1. Concentrações do 2,4-D utilizadas. Campina Grande, 2012.

Tratamentos	2,4-D mg.L ⁻¹
T0	0,0
T1	10
T2	20
T3	30
T4	40

Foram realizadas 10 repetições, tendo como unidade experimental uma placa de Petri com 10 explantes, considerando um delineamento experimental inteiramente casualizado com

cinco concentrações. A avaliação foi realizada aos 30 dias de cultivo com auxílio de uma lupa 30x21mm, mensurando como variável o número de embriões somáticos por explante (NES).

4.4 Regeneração

Após a avaliação, os embriões somáticos foram subcultivados em meio MS sem regulador de crescimento e mantidos no escuro a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 30 dias para o desenvolvimento dos embriões somáticos. Após o período, os embriões somáticos (ES) foram separados em condições assépticas e inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio $\frac{1}{2}$ MS, e mantidos 72 horas no escuro, e em seguida, transferidos para fotoperíodo de 16 h de luz e intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

4.5 Aclimatização e transplante para casa de vegetação

As plântulas regeneradas foram cuidadosamente removidas dos tubos de ensaio, lavadas em água corrente e aclimatizadas em copos de polipropileno contendo turfa e vermiculita numa proporção de 2:1 previamente esterilizada. Logo após, as plântulas foram cobertas com copos plásticos borrifados com água destilada para manter a umidade. As condições de temperatura e luminosidade foram às mesmas da regeneração. A cobertura foi retirada gradativamente, até sua completa remoção. Depois da aclimatização, as plantas foram levadas para a casa de vegetação para completar seu ciclo.

4.6 Aplicações da espectroscopia NIR

Os procedimentos metodológicos da análise dos perfis proteicos e de componentes principais no NIR estão ilustrados na figura 3. Todas as amostras foram analisadas de maneira não destrutiva usando medidas de reflectância na região de 400 a 2500 nm com espectrômetro VIS-NIR modelo XDS Analyser (Figura 3A).

Inicialmente foram realizadas medidas espectroscópicas nas sementes de amendoim *in natura* (Figura 3B) e nos embriões zigóticos (Figura 3C) antes da indução. Logo após, os explantes foram desinfestados e inoculados em placas de Petri com meio MS conforme os tratamentos mencionados na tabela 1.

Aos 30 dias de cultivo quando se observou os embriões somáticos nos explantes, foram realizadas medidas de refletância (Figura 3D), obtendo-se espectros de 6 repetições autênticas por tratamento. Em cada célula (3E) foram postos 15 explantes contendo embriões somáticos em desenvolvimento.

Foram analisados os explantes induzidos em meio MS, sem regulador de crescimento, e suplementado com 30 mg.L^{-1} , sendo analisados os espectros dos embriões somáticos aos 30, 40 e 50 dias de cultivo.



Figura 3. Análise dos perfis proteicos e de componentes principais no NIR: (A) Análise dos embriões somáticos de amendoim no espectrômetro XDS Analyser; (B) célula com sementes, (C) embriões zigóticos, (D) e com embriões somáticos de amendoim; (E) célula preparada para análise no NIR.

Foto: A. M. M. Alves. Campina Grande, 2012.

4.7 Análises estatísticas

4.7.1 Embriogênese somática

Os dados foram transformados pela função $\sqrt{x+1}$ e submetidos à análise de variância, sendo os dados do tratamento quantitativo (concentrações do 2,4-D) submetidos à análise de regressão polinomial. Para o processamento dos dados, foi utilizado o software Statistical Analysis System versão 9.2 (SAS\STAT, 2009).

4.7.2 *Quimiometria*

Os espectros brutos foram pré-processados em primeira e segunda derivada, utilizando o algoritmo proposto por Savitzky e Golay (1964), janela de 11 pontos, e ajustados por polinômio de segunda ordem para correção de linha de base e efeito de espalhamento de radiação.

A região entre 1100 a 2500 nm foi selecionada para análise de componentes principais (PCA) de todos os grupos analisados, os quais as variáveis constituem-se dos comprimentos de onda, e a resposta destas, são os valores de reflectância para as regiões de 1300 a 1500 nm e 2100 a 2300 nm, que foram selecionadas para análises exploratórias, por serem atribuídas a presença de ligações N–H das proteínas.

Utilizou-se como ferramenta para a modelagem, o programa estatístico The Unscrambler®, na versão 9.8. Os modelos se basearam na aplicação da técnica de PCA como uma estratégia para observação da existência de formação de agrupamentos e de padrão, para as amostras e tratamentos estudados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os embriões zigóticos foram induzidos em meio MS (Figura 4A), e após 30 dias de cultivo, observou-se embriogênese somática direta em amendoim, a partir das diferentes concentrações do 2,4-D. Como pode ser observado na figura 4B, o meio MS sem regulador de crescimento não proporcionou a embriogênese somática, o que vem a corroborar com Zimmermann (2010) que menciona a importância primordial dos reguladores na indução de ES.

A análise da variância, tabela 2, refere-se ao número de embriões somáticos (NES) em amendoim, verifica-se que houve diferenças significativas a 5% de probabilidade pelo teste F, para o fator quantitativo estudado, bem como para os padrões de comportamento linear e quadrático.

Tabela 2. Resumo da análise de variância referente ao número de embriões somáticos em amendoim 30 dias após o cultivo em meio MS suplementado com diferentes concentrações do 2,4-D. Campina Grande-PB, 2012.

F.V.	G.L.	Quadrados médios
Concentração	4	2,37**
Regressão Linear	1	8,082**
Regressão Quadrática	1	1,355**
Desvio de Regressão	2	0,1022 ^{NS}
Erro	45	0,168
CV%		23,42

** Significativo ($P < 0,01$) pelo Teste F.

^{NS} Não significativo ($P > 0,05$).

Na figura 4, observa-se o padrão de comportamento polinomial quadrático para NES. Verifica-se que foi obtida uma concentração máxima de $34,4 \text{ mg.L}^{-1}$ do 2,4-D para obter-se em média 2,14 embriões somáticos por explante.

Resultados semelhantes foram obtidos por Campos et al., (2009), em estudo sobre a embriogênese somática em *Pennisetum* sp., constataram comportamento quadrático nos percentuais de calo embriogênico, quando ao meio foi adicionado concentrações gradativas ($1-3 \text{ mg.L}^{-1}$) do 2,4-D.

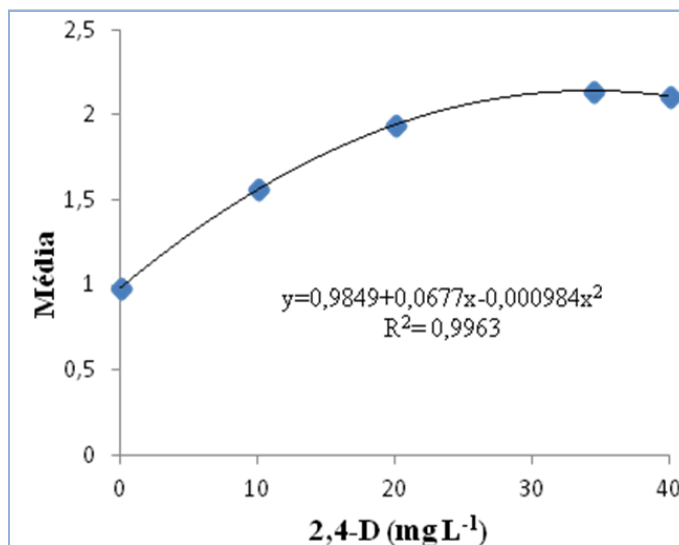


Figura 4. Efeito concentrações das concentrações do 2,4-D, no número de ES de amendoim. Campina Grande, 2012.

Na tabela 3, observam-se os valores médios referentes ao NES provenientes das diferentes concentrações do 2,4-D, constatando-se menor e maior NES ao se utilizar 10 e 30 mg.L⁻¹ (Figura 4C e E), respectivamente.

Tabela 3. Valores médios referentes à variável número de embriões somáticos (MNES) em amendoim, 30 dias após o cultivo em meio MS suplementado com diferentes concentrações do 2,4-D. Campina Grande-PB, 2012.

2,4-D (mg.L ⁻¹)	MNES ¹
0,0	1,000
10	1,538
20	1,932
30	2,177
40	2,102

¹Transformados em $\sqrt{x+1}$

O 2,4-D é um agente indutor muito utilizado, pois induz genes responsáveis pela sinalização do processo de embriogênese somática (ZIMMERMANN, 2010). Bhanumathi et al. (2005) também observaram que concentrações entre 10-45 mg.L⁻¹ do 2,4-D induzem a embriogênese somática em amendoim, no entanto, o picloram 27,5 mg.L⁻¹ mostrou melhor resposta para a indução direta de ES. Enquanto que, Venkatesh et al., (2009) constataram que o 2,4-D favoreceu a melhor resposta para embriogênese somática em amendoim, em comparação ao picloram.

Como pode ser observado na figura 4, o tratamento utilizado interferiu no aspecto dos ES. Na figura 5C e F, observa-se que a menor e a maior concentração do 2,4-D ocasionaram

oxidação, o que contrapõe Barrueto Cid e Teixeira (2010) que cita evidências de que altas concentrações do 2,4-D no meio de cultura reduz a oxidação dos explantes.

Ao ser utilizadas concentrações intermediárias (Figura 4D e E), os ES apresentaram-se brancos e transparentes, em conformidade com os trabalhos consultados que os descrevem com estruturas brancas (GANESAN; JAYABALAN, 2004; BHANUMATHI et al., 2005).

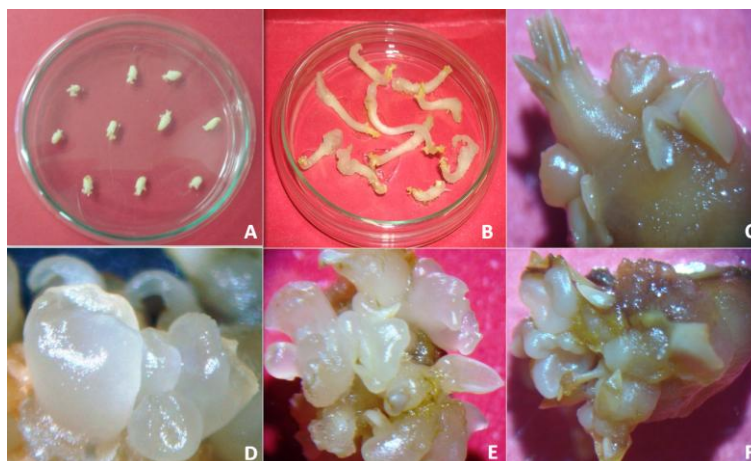


Figura 5. Embriogênese somática em amendoim: (A) Embriões zigóticos de amendoim recém inoculados em meio MS com 2,4-D; (B) aspecto dos explantes cultivados em meio MS sem regulador de crescimento; (C, D, E, F) embriões somáticos provenientes do cultivo com 10, 20, 30 e 40 mg.L⁻¹ do 2,4-D, respectivamente. Foto: Á. M. M. Alves. Campina Grande, 2012.

Após o desenvolvimento dos ES em meio MS sem regulador de crescimento, as plântulas foram regeneradas em ½ MS (Figura 5A), possibilitando assim, a aclimatização (Figura 5B) e transplante para casa de vegetação (Figura 5C), com a finalidade de completar o crescimento e desenvolvimento (Figura 5D).

Estas etapas são extremamente importantes, pois é possível observar se o desenvolvimento dos embriões será de forma sincronizada, se haverá deformações e/ou precocidade (JUNQUEIRA, et al., 2001). Além disso, a possibilidade de estudar as plantas regeneradas em casa de vegetação é fundamental, pois assim, observa-se sua adaptação ao ambiente *ex vitro* e seu ciclo reprodutivo, bem como fenômenos epigenético ou variação somoclonal (BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2010; JUNQUEIRA, et al., 2001).

Segundo Gratapaglia e Machado (1990), a aclimatização é um processo decisivo na micropropagação, pois neste momento a planta vai passar por várias modificações nas condições fisiológicas, tais como: troca de um ambiente de baixa transpiração para outro com variação na taxa de transpiração; mudança de heterotrofia para autotrofia.



Figura 6. Desenvolvimento das plântulas provenientes da ES em amendoim: (A) Plântula em meio de regeneração; (B) plântula aclimatizada; (C) transplantada para casa de vegetação e (D) primeira floração.

Foto: Á. M. M. Alves. Campina Grande, 2012.

Com relação às análises no NIR, na figura 7 observa-se os espectros brutos originados da análise das sementes *in natura* de amendoim, dos embriões zigóticos (EZ) isolados, antes da indução no meio de cultura, separa-se muito bem dos embriões somáticos (ES) provenientes do meio MS suplementado com as diferentes concentrações do 2,4-D. Dessa forma, a região analisada (400 a 2500 nm), permitem uma fácil distinção dos espectros obtidos a partir das amostras estudadas.

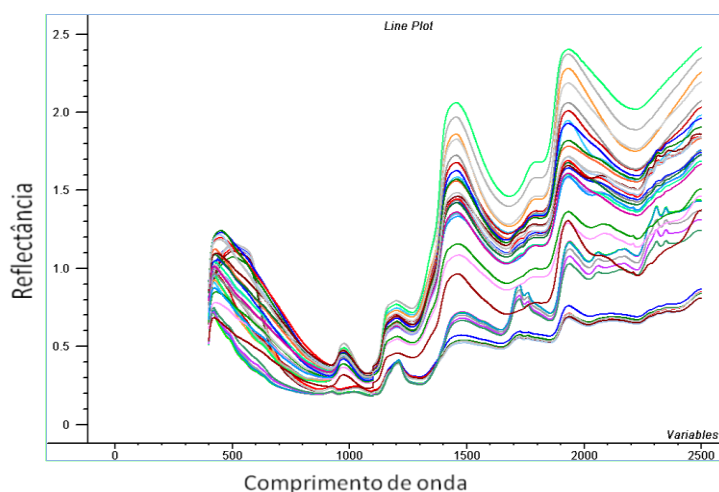


Figura 7. Espectros de reflectância no NIR (400 a 2500 nm), obtidos da análise de sementes, embriões zigóticos e embriões somáticos de amendoim provenientes do meio MS suplementado com diferentes concentrações do 2,4-D, 30 dias após o cultivo. Campina Grande, 2012.

Observam-se na figura 8, os espectros derivados na região de 400 a 2500 nm obtidos do pré-processamento dos dados obtidos na análise das sementes, EZ e ES de amendoim provenientes do meio MS suplementado com diferentes concentrações do 2,4-D. Verifica-se que, com o pré-processamento, foi possível evidenciar as diferenças entre as classes das amostras em regiões específicas de absorção.

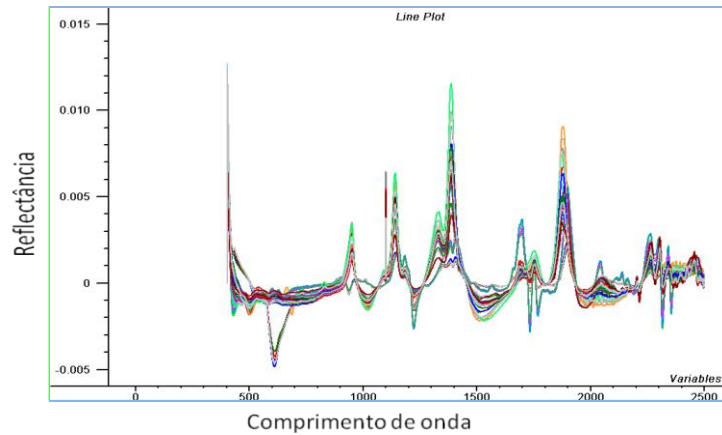


Figura 8. Espectros derivativos (na região de 400 a 2500 nm) obtidos do pré-processamento dos dados das amostras de sementes, embriões zigóticos e embriões somáticos de amendoim provenientes do meio MS suplementado com diferentes concentrações do 2,4-D, 30 dias após o cultivo. Campina Grande, 2012.

Na figura 9 observa-se os escores do PC1 x PC2, e a variância explicada nesta análise foi de 98% havendo uma separação das sementes, dos EZ e ES provenientes dos tratamentos (T) com 2,4-D. Os agrupamentos arranjados pelas sementes, EZ, T3 e T4 foram mais bem definidos, enquanto que os T1 e T2 apresentaram-se mais espalhados, o que representa uma variação na composição química dessas amostras (FERRARI, 2004).

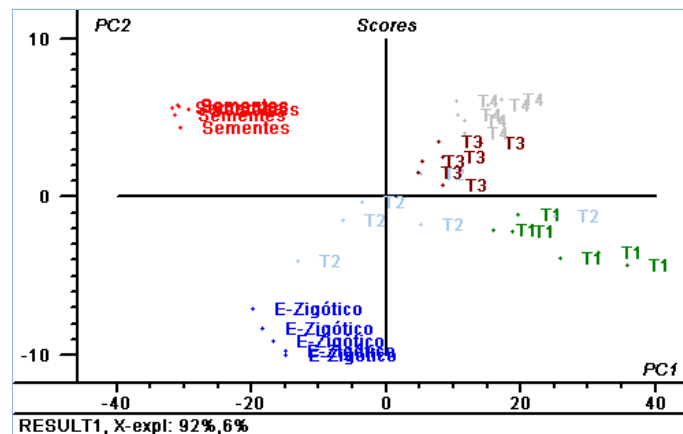


Figura 9. Escores do PC1 x PC2 (na região 1100 a 2500) aplicado ao conjunto das amostras de sementes, embriões zigóticos e embriões somáticos de amendoim provenientes do meio MS suplementado com diferentes concentrações do 2,4-D, 30 dias após o cultivo. Campina Grande, 2012.

Os escores do PC1 x PC2 nas regiões espectrais de 1300 a 1500 nm e de 2100 a 2300 nm estão representados na figura 10, sendo possível observar agrupamentos bem definidos pelas sementes, EZ e ES provenientes do T3 e T4, em comparação ao T1 e T2, que apresentam-se mais espalhados nessa região do espectro. Nessa análise ocorreu uma separação de 99% da variância explicada. A região espectral selecionada, segundo Ferrari (2004), é uma região de determinação de proteína, pois, atribui-se à presença de ligações entre

nitrogênio e hidrogênio (N – H), assim algumas amostras são bem diferenciadas tanto pela umidade, como também pelos valores de proteína total. Os dados demonstram também que aos 30 dias de cultivo, que o tratamento mais semelhante ao explante (EZ) é o T2, enquanto o mais distinto é o T1.

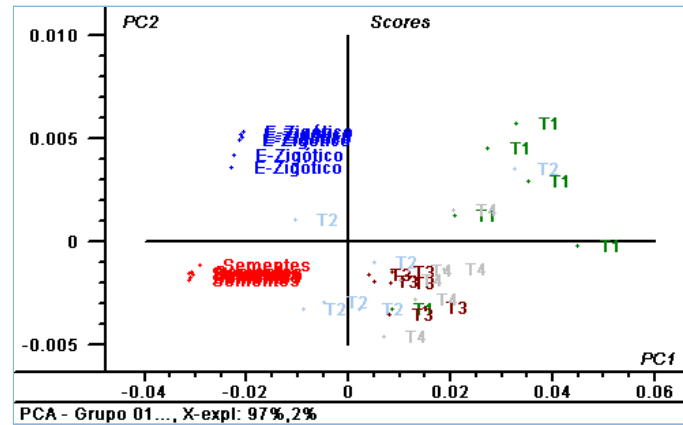


Figura 10. Escores do PC1 x PC2 (na região de 1300 a 1500 nm e 2100 a 2300 nm) aplicado ao conjunto das amostras de sementes, embriões zigóticos e embriões somáticos de amendoim provenientes do meio MS suplementado com diferentes concentrações do 2,4-D, 30 dias após o cultivo. Campina Grande, 2012.

Na figura 11, observa-se os espectros brutos de EZ de amendoim antes e após indução em meio MS sem regulador de crescimento e de ES provenientes de meio MS suplementado com 30 mg.L^{-1} do 2,4-D aos 30, 40 e 50 dias de cultivo. Os espectros obtidos também permitem uma fácil distinção entre os EZ, em comparação as amostras com o meio de cultura.

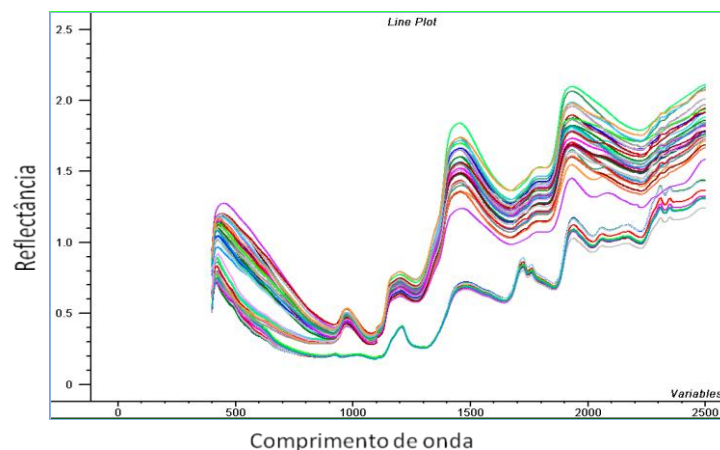


Figura 11. Espectros de reflectância no NIR (400 a 2500 nm), obtidos da análise de embriões zigóticos de amendoim antes e após indução em meio MS sem regulador de crescimento, e de embriões somáticos provenientes de meio MS suplementado com 30 mg.L^{-1} do 2,4-D aos 30, 40 e 50 dias de cultivo. Campina Grande, 2012.

Espectros derivativos na região de 400 a 2500 nm obtidos do pré-processamento dos dados da análise de EZ de amendoim antes e após indução em meio MS, sem regulador de

crescimento, e de ES provenientes de meio MS suplementado com 30 mg.L^{-1} do 2,4-D aos 30, 40 e 50 dias de cultivo encontram-se na figura 12, e também evidencia as diferenças entre as amostras em regiões específicas.

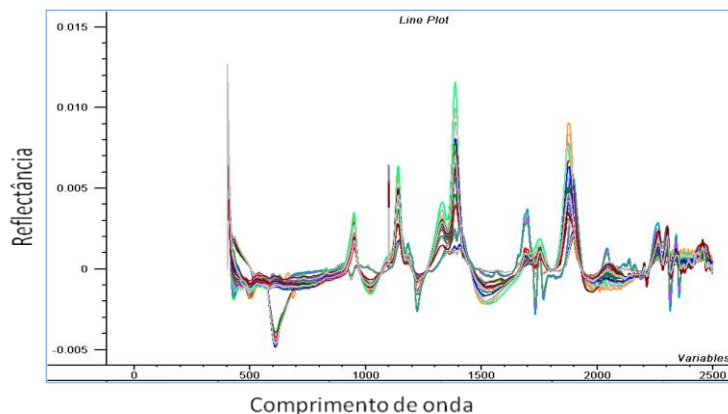


Figura 12. Espectros derivativos (na região de 400 a 2500 nm) obtidos do pré-processamento dos dados das amostras de embriões zigóticos de amendoim antes e após indução em meio MS sem regulador de crescimento, e de embriões somáticos provenientes de meio MS suplementado com 30 mg.L^{-1} do 2,4-D aos 30, 40 e 50 dias de cultivo. Campina Grande, 2012.

A aplicação da análise de componentes principais (PCA), à matriz dos espectros resultou nos escores apresentado na figura 13. A PC1 x PC2 descrevem 98% da variância explicada dos dados. Observa-se que ocorreu agrupamentos determinados pelo tempo de indução (30, 40 e 50 dias) em meio MS, suplementado com 30 mg.L^{-1} do 2,4-D em comparação com os EZ. As amostras mais homogêneas foram obtidas nos estádios iniciais dos ES, ou seja, aos 30 dias de cultivo. Enquanto que, os agrupamentos das amostras sem ES (T0) foram pouco definidos.

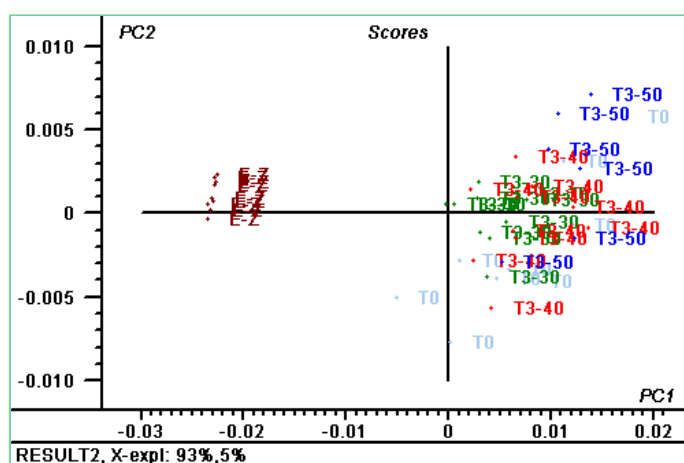


Figura 13. Escores do PC1 x PC2 (na região 1100 a 2500) aplicado ao conjunto das amostras de embriões zigóticos de amendoim antes e após indução em meio MS sem regulador de crescimento, e de embriões somáticos provenientes de meio MS suplementado com 30 mg.L^{-1} do 2,4-D aos 30, 40 e 50 dias de cultivo. Campina Grande, 2012.

Na figura 14, encontra-se os escores do PC1 x PC2 nas regiões espectrais 1300 a 1500 nm e 2100 a 2300 nm, também sendo possível observar agrupamentos definidos pelos EZ, e ES com diferentes dias de cultivo. A variância explicada nesta análise foi de 98%. A partir desta análise é possível observar que aos 30 dias de cultivo, os ES são mais semelhantes aos EZ. Dessa maneira observa-se uma relação entre o proteoma de ES em fase iniciais e os EZ. Constata-se também uma expressão diferencial ao longo do desenvolvimento dos ES.

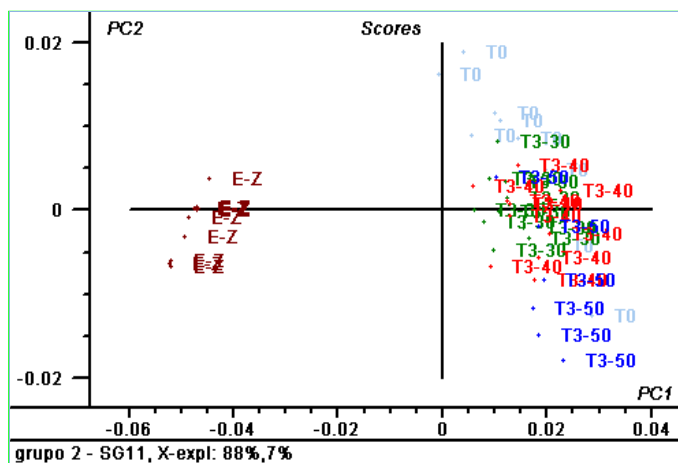


Figura 14. Escores do PC1 x PC2 (na região de 1300 a 1500 nm e 2100 a 2300 nm) aplicado ao conjunto das amostras de embriões zigóticos de amendoim antes e após indução em meio MS sem regulador de crescimento, e de embriões somáticos provenientes de meio MS suplementado com 30 mg.L⁻¹ do 2,4-D aos 30, 40 e 50 dias de cultivo. Campina Grande, 2012.

Com base nos gráficos de PCA, obteve-se uma separação dos grupos analisados, dessa forma os dados vem a corroborar com as informações de que em diferentes estágios da embriogênese somática ocorre uma variação na expressão de genes, e junto à síntese de novas proteínas. Pode ocorrer também à eliminação de alguns polipeptídios de estágios anteriores, os quais no momento são desnecessários (ZIMMERMANN, 2010).

Moraes (2006) estudou a relação entre as proteínas expressas e os estádios de desenvolvimento de ES de *Ocotea catharinensis* MEZ., bem como, entre o meio de cultura utilizado, através da técnica de eletroforese bidimensional (2-DE), e constatou que há uma expressão conservativa do proteoma ao longo do desenvolvimento dos ES. Dessa forma, as características que diferenciam cada estágio do ES são provavelmente consequência da expressão diferencial de um número limitado de proteínas, muitas vezes não detectáveis por 2-DE.

O uso do NIR, no presente estudo também permitiu uma visão geral do proteoma em amendoim, mostrando a influência entre a escolha do meio de cultura e os espectro obtidos na

análise dos ES, e poderá emergir como uma estratégia para auxiliar estudos que visem à compreensão dos fatores associados à embriogênese somática, e a identificação de proteínas através da cromatografia líquida acoplada a MS/MS, para então associar os genes envolvidos.

A estratégia de se utilizar o NIR nas análises de proteoma em amendoim, também se mostrou eficiente por apresentar um menor custo, serem simples e rápidas, e a não necessidade de destruir as amostras, o que dispensa do uso de reagentes, muitas vezes prejudiciais para saúde, além disso, não gera resíduos que provocam danos ao meio ambiente (VILAR et al., 2011).

6. CONCLUSÕES

Com a realização desta pesquisa, nas condições do ensaio, foi possível concluir que:

- O 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) induz a embriogênese somática em amendoim, sendo a melhor de $34,4 \text{ mg.L}^{-1}$;
- A espectroscopia no infravermelho próximo permite a análise proteômica em sementes, embriões zigóticos e embriões somáticos de amendoim;
- A faixa espectral de 1100 a 2500 dos espectros pré-processados é representativa para comparação das amostras;
- A região de 1300 a 1500 nm e 2100 a 2300 nm é representativa para observação do perfil proteico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J. A. S. Da folha à obtenção de embriões somáticos de Coffea. **O Agrônomo**, v.1, n.59, 2007. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/publicacoes/agronomico/>>. Acesso em: 04 jul. 2011.

ALVES, S. A. O. **Resgate *in vitro* de híbridos interespecíficos de dendezeiro (*Elaeis guineensis* x *Elaeis oleifera*)**. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Pará, 2008. Disponível em: <<http://www.posbot.ufra.edu.br/discentes/>>. Acesso em: 17 jun. 2012.

ANDRADE, J. M. **Análise diferencial do proteoma de polpa de manga (*Mangifera indica* L.) e identificação de proteínas com variação de abundância durante o amadurecimento pós-colheita**. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-01082011-152914/pt-br.php>>. Acesso em: 18 jun. 2012.

ARGOUT, X.; SALSE, J.; AURY, J.; GUILTINAN, M. J. The genome of *Theobroma cacao*. **Nature Genetics**, n.43, p.p. 101-108, 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/ng/journal/v43/n2/full/ng.736.html>>. Acesso em: 18 jun. 2012.

BAIANU I. C.; COSTESCU, D.; YOU, T.; LOZANO, P. R.; HOFMANN, N. E.; KORBAN, S. S. Near Infrared Microspectroscopy, Fluorescence Microspectroscopy, Infrared Chemical Imaging and High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Analysis of Soybean Seeds, Somatic Embryos and Single Cells. **Oil Extraction and Analysis**, Kansas, USA, p.p. 241-282, 2003. Disponível em: <<http://cdsweb.cern.ch/record/768089/files/ext-2004-068.pdf>>. Acesso em: 04 de jul. 2011.

BAIANU, E.; GUO, J. Development of novel calibrations for FT-NIR analysis of protein, Oil, carbohydrates and isoflavones in Foods. **Nature Precedings**, n.6317.1, 2011. Disponível em: <<http://precedings.nature.com>>. Acesso em: 19 jun. 2012.

BAGINSKY, S.; GRUISSEM, W. Arabidopsis thaliana proteomics: from proteome to genome. **Journal of Experimental Botany**, v.57, n.7, p.p. 1485-1491, 2006. Disponível em: <<http://jxb.oxfordjournals.org>>. Acesso em: 18 jun. 2012.

BARRUETO CID, L. P.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In.: BARRUETO CID, L. P. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, p.p 17-43, 2010.

_____. Oxidação fenólica, vitrificação e variação somoclinal. In.: _____. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, p.p 51-62, 2010.

BELTRÃO, N. E. M.; SOUSA JÚNIOR, S. P.; OLIVEIRA, M. I. P.; FIDELES FILHO, J.; SILVA, M. N. B. Ecofisiologia do amendoim (*Arachis hypogaea* L.). In. BELTRÃO, N. E. M.; OLIVEIRA, M. I. P. de. **Ecofisiologia das culturas de algodão, amendoim, gergelim, mamona, pinhão manso e sisal**. Brasília, DF: Embrapa Informações Tecnológicas, 2011, 322p.

BHANUMATHI, P.; GANESAN, M.; JAYABALAN, N. A simple and improved protocol for direct and indirect somatic embryogenesis of peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Journal of Agricultural Technology**, v.1, n.2, p.p. 327-344, 2005. Disponível em: <http://www.ijat-aatsea.com/pdf/pdf2/WAT06_2005.pdf>. Acesso em: 04 jul. 2011.

BISCH, P. M. Genoma funcional. In.: MIR, L. **Genômica**. Ed. Atheneu, São Paulo, p.p 159-162, 2004.

BOLONHEZI, D.; GODOY, I. J.; SANTOS, R. C. Manejo Cultural do amendoim. In: SANTOS, R. C. **O Agronegócio do Amendoim no Brasil**. Embrapa Algodão, Campina Grande, p.p. 193-244, 2005.

BRERETON, RICHARD G. **Chemometrics**. Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant. Chichester, Willey online library, p.p 1-14 2003. Disponível em: <http://media.wiley.com/product_data/excerpt/86/04714897/0471489786.pdf>. Acesso em 19 jun. 2011.

BRUCE, P. Y. **Química Orgânica**. 4. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, v.1, 2006.

BULGARELLI, E. M. B. **Caracterização de variedades de amendoim cultivadas em diferentes populações**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, 2008. Disponível em: <www.athena.biblioteca.unesp.br/exlibris/bd/bja/33004102029P6/2008/bulgarelli_emb_me_jabo.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2012.

CALDAS, L. S.; PADMAJA, H.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Embrapa, Brasília, p.p. 87-132, 1998.

CAMOLESI, V. J. **Caracterização do querose através da espectroscopia no infravermelho próximo**. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/3/3137/>>. Acesso em: 19 jun. 2012.

CAMPOS, J. M. S.; CALDERANO, C. A.; PEREIRA, A. V.; DAVIDE, L. C.; VICCINI, L. F.; SANTOS, M. O. Embriogênese somática em híbridos de *Pennisetum* sp. e avaliação de estabilidade genômica por citometria. **Pesq. agropec. bras., Brasília**, v.44, n.1, p.p. 38-44, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pab/v44n1/06.pdf>>. Acesso em: 17 jun. 2012.

CARVALHO, J. M. F.; VIDAL, M. S. **Noções de Cultivo de Tecidos Vegetais**. Embrapa Algodão. Documentos, 116, Campina Grande, 2003.

_____; SILVA, M. M. A.; MEDEIROS, M. J. L.; ARAÚJO, S. S.; MILANI, M. Composição e concentrações do meio de cultivo sobre o superbrotaamento *in vitro* da mamoneira na cultivar BRS Paraguaçu. **Rev. bras. ol. fibros.**, v.12, n.3, p.p. 119-124, 2008. Disponível em: <<http://www.cnpa.embrapa.br/rbof/artigos/>>. Acesso em: 16 jun. 2012.

CHUGH, A.; KHURANA, P. Gene expression during somatic embryogenesis – recent advances. **Current Science**, v.83, n.6, 2002.

COSTA FILHO, P. A.; POPPI, R. J. Aplicação de algoritmos genéticos na seleção de variantes em espectroscopia no infravermelho médio. Determinação simultânea de glicose, maltose e frutose. **Química Nova**, v.25, n.1, p.p. 46-52, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v25n1/10423.pdf>>. Acesso em: 19 jun. 2012.

CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, v.30 p. 481, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v30n2/41.pdf>>. Acesso em: 19 jun. 2012.

DANTAS, H. V. **Triagem da qualidade de amostras de GNV e GLP usando espectrometria NIR e quimiometria**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2010. Disponível em: <http://www.quimica.ufpb.br/posgrad/dissertacoes/Dissertacao_Hebertty_Vieira_Dantas.> Acesso em: 19 jun. 2012.

DANTAS, J. P. **Recomendações técnicas: Amendoim, banana, côco, feijão, maracujá, milho e mamão**. Embrapa, 1999. 56p.

DIAS, L. L. C.; FLOH, E. I. S.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V. **Proteômica comparativa aplicada à cultura de tecidos de plantas**. Campos dos Goytacazes, RJ, 2000. Disponível em: <http://www.biota.org.br/publi/banco/docs/18502_1203966649.pdf >. Acesso em: 04 jul. 2011.

DIAS, L. L. C.; BALBUENA, T. S.; SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C.; SCHEVCHENKO, A.; FLOH, E. I. S. Two-dimensional gel electrophoretic protein profile analysis during seed development of *Ocotea catharinensis*: a recalcitrant seed species. **Braz. J. Plant Physiol.**, v.22, n.1, p.p. 23-33, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjpp/v22n1/v22n1a03.pdf>>. Acesso em: 18 jun. 2012.

FERRARI, H. **Determinação de teores nutricionais do milho por espectroscopia no infravermelho e calibração multivariada**. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/991/Ferrarini,%20Hair.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 19 jun. 2012.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v.22, p.724-731, 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40421999000500016&script=sci_arttext>. Acesso em: 04 jun. 2011.

FREIRE, R. M. M.; FIRMINO, P. T.; SANTOS, R. C. Importância e utilização do amendoim na dieta alimentar. **Óleos e Grãos**, São Paulo, v.8, n.44, p.p. 40-42, 1998.

FURTADO, C. M.; CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, H.; CASTRO, J. P.; SANTOS, J. W. dos; e SANTOS, T. da S. Indução do superbrotamento de amendoim cultivar BR-1 através do cultivo *in vitro*. **Rev. bras. ol. fibros.**, Campina Grande, v.7, n.2/3, p.p. 685-691, 2003. Disponível em: <http://www.cnpa.embrapa.br/rbof/artigos/722003001_rbof,7%282-3%29,685-691,2003.pdf>. Acesso em: 16 jun. 2012.

GAMBORG, O.; MILLER, R.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Exp. Cell. Res.**, v.50, p.p.150-158, 1968. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0014482768904035>>. Acesso em: 04 jul. 2011.

GANESAN, M.; JAYABALAN, N. Evaluation of haemoglobin (erythrogen): for improved somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR). **Plant Cell Reports**, n.2, p.p. 181-187, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15278417>>. Acesso em 19 jun. 2012.

GOLLE, D. P. **Estabelecimento, multiplicação, calogênese, organogênese *in vitro* e análise da diversidade genética em acessos de *Eugenia involucrata* dc.** Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2010. Disponível em: <<http://www.vsdani.com/ppgef/tesesdissertacoes/>>. Acesso em: 19 jun. 2012.

GRACIANO, E. S. A. **Estudos fisiológicos e bioquímicos de cultivares de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) submetidas à deficiência hídrica.** Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009. Disponível em: <http://www.pgb.ufrpe.br/doctos/2009/dissertacoes/DISSERTACAO_ERIKA_SOCORRO_ALVES_GRACIANO.PDF>. Acesso em: 18 jun. 2012.

GRATAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. L.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas.** Brasília, DF: ABCTP: EMBRAPA – CNPH, 1990, p. 89-164.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (eds.). **Culturas de Tecidos e Transformação Genética de Plantas.** Brasília, Embrapa, v.2. p.p. 533-568, 1999.

HOGBERG, K. A.; EKBERG, I.; NORELL, L.; VON ARNOLD, S. Integration of somatic embryogenesis in a tree breeding programme: a case study with *Picea abies*. **Can. J. For. Res.**, v.28, p.p.1536-1545, 1998. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/>>. Acesso em: 19 jun. 2012.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental.**-6 ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, n.47, p.p. 91-110, 2005. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/p2h5213p05116142/>>. Acesso em: 04 jul. 2011.

JUN GUO.; YOU, T.; PRISECARU, V. D. C. NIR calibration for soybean seeds and soy food composition analysis: total carbohydrates, oil, proteins and water contents. **Nature Precedings**, 6611.2, 2011. Disponível em: <<http://precedings.nature.com/documents/6611/>>. Acesso em: 04 jul. 2011.

JUNQUEIRA, C. S.; SOUZA, C. W.; TEIXEIRA, J. B. Regeneração de embriões a partir de calo embriogênico friável do tipo HFSE de duas espécies de café (*Coffea canephora*, *Coffea arabica*). In.: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2, 2001, Vitória, **Anais eletrônicos...** Vitória: Embrapa Café, 2001. Disponível em:

<http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/10820/751/155585_Art055f.pdf?sequence=1>. Acesso em: 18 jun. 2012.

LANÇAS, F. M.; SILVA, J. C. R.; BICUDO, R. C.; BENASSI NETO, M. A química analítica do proteoma. **Revista Analytica**, n.06, 2003. Disponível em: <http://www.revistaanalytica.com.br/ed_anteriores/06/6%20Art%20Proteoma.pdf>. Acesso em: 04 jul. 2011.

LEMOS, O. F. P. **Mutagênese e tecnologia *in vitro* no melhoramento genético de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.)**. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2003. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11137/tde-07042003-161151/pt-br.php>>. Acesso em: 19 jun. 2012.

MATSUMOTO, K. Giberelinas. In: BARRUETO CID, L.P. (Ed.). **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: Embrapa/Cenargen, p. 83-105, 2000.

MONTES, J. M.; MELCHINGER, A. E.; REIF, J. C. Novel throughput phenotyping platforms in plant genetic studies. **Plant Science** v.12 n.10, 2007. Disponível em: <<http://www.cell.com/trends/plant-science/abstract/S1360-1385%2807%2900185-9>>. Acesso em: 18 jun. 2012.

MORAES, F. M. S. **Análise proteômica da embriogênese somática e da aquisição de competência embriogênica de *Ocotea catharinensis* MEZ. (Lauracea)**. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, UNB, Brasília, 2006. Disponível em: <<http://repositorio.bce.unb.br/handle/10482/3164>>. Acesso em: 04 jul. 2011.

MORAES, S. A. **Amendoim: Principais doenças, manejo integrado e recomendações de controle**. Embrapa, 2006.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture**. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x/abstract>>. Acesso em: 04 jul. 2011.

NASCIMENTO, E. C. L. **Um fotômetro microcontrolado LED-NIR, portátil e de baixo custo para análise screening de gasolinas tipo C**. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008. Disponível em: <http://www.quimica.ufpb.br/posgrad/teses/Tese_Elaine_Cristina.pdf>. Acesso em: 19 de jun. 2012.

OZIAS-AKINS, P.; ANDERSON, W. F.; HOLBROOK, C. C. Somatic embryogenesis in *Arachis hypogaea* L.: genotype comparison. **Plant Science**, v.83, 103-11, 1992. Disponível em: <http://nspal.org/oziasakinslab/pubs/Ozias-AkinsP1992PlantSci83_103.pdf>. Acesso em: 04 jul. 2011.

PAIS, M. S. S. Biotecnologia vegetal. In: LIMA, N.; MOTA, M. **Biotecnologia: fundamentos e aplicações**. Ed. LIBEL, Lisboa – Porto, 2003.

PEREIRA, A. F. C. **Determinação simultânea de acidez, índice de refração e viscosidade em óleos vegetais usando espectrometria NIR, calibração multivariada e seleção de**

variáveis. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007. Disponível em: <<http://www.quimica.ufpb.br/posgrad/dissertacoes/>>. Acesso em: 19 jun. 2012.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RIBEIRO, C. S. N.; SILVA, H.; SANTOS, J. W.; CARVALHO, J. M. F. C. Efeito do tiadiazuron na micropropagação *in vitro* de dois genótipos de mamona via organogênese. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, n.4, p. 366–371, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbeaa/v14n4/v14n04a04.pdf>>. Acesso em: 04 jul. 2011.

SALVATO, F.; CARVALHO, M. C. C. G. Métodos e estratégias em proteômica e suas aplicações na área vegetal. **Ciência Rural**, v.40, n.3, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v40n3/a479cr1680.pdf>>. Acesso em: 18 jun. 2012.

SANTOS, T. S.; ALMEIDA, F. A.; SUASSUNA, T. M. F.; COUTINHO, W. M.; ALMEIDA, P. B. A. Resposta de sementes de amendoim a diferentes doses de radiação gama ($^{60}\text{Co}^1$). **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, n.10, p.1074–1078, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbeaa/v14n10/v14n10a08.pdf>>. Acesso em: 15 jun. 2012.

SANTOS, C. S. P. **Isolamento de genes de resistência a *Phytophthora cinnamomi* e definição de um protocolo de transformação genética em *Castanea sativa***. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia), Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Portugal, 2010. Disponível em: <<http://repositorio.ul.pt/handle/10451/2504>>. Acesso em: 18 jun. 2012.

SANTOS, R. C.; GODOY, J. I.; FÁVERO, A. P. Melhoramento do amendoim. In: SANTOS, R. C. **O Agronegócio do Amendoim no Brasil**, Ed. Campina Grande, EMBRAPA, p.123-192, 2005.

SAS Institute Inc. 2009. **SAS Online Doc®: 9.2**. Cary, NC: SAS, Institute Inc.

SAVITZKY, A.; GOLAY, M. J. E. Smoothing and differentiation of data by simplified leastsquares procedures. **Analytical Chemistry**, v.36, n.8, p. 1627-1639, 1964. Disponível em: <<http://www.ee.oulu.fi/research/tklab/courses/>>. Acesso em: 17 jun. 2012.

SILVA, A. M. S.; CORRÊA, G. C.; REIS, E. M. Proteômica – uma abordagem funcional do estudo do genoma. **Saúde e Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v.2, n.2, p.01-10, 2007. Disponível em: <http://www.unigranrio.br/unidades_acad/ibc/sare/v02n02/>. Acesso em: 04 jul. 2011.

SKOOG, D. A., WEST, D. N. HOLLER, F.J., CROUCH, S.R. **Fundamentos de Química Analítica**, 8ª ed. 2007.

SOUSA, M. V.; FONTES, W.; RICART, C. A. O. Análise de proteomas. O Despertar da era pós-genômica. **Revista Biotec. Ciênc. e Desenvol.**, 2007. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio07/analise.pdf>>. Acesso em: 04 jul. 2011.

SOUZA, N. R.. **Avaliação da formação de piromorfita em solos contaminados com Pb através de espectroscopia no infravermelho**. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Materiais) - Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2005. Disponível em: <<http://www.fqm.feis.unesp.br/pos/teses/disser-30.pdf>>. Acesso em: 18 jun. 2012.

WOLKERS, W. F.; TETTEROO, F. A. A.; ALBERDA, M.; HOEKSTRA, F. A. Changed Properties of the Cytoplasmic Matrix Associated with Desiccation Tolerance of Dried Carrot Somatic Embryos. An in Situ Fourier Transform Infrared Spectroscopic Study. **Plant Physiology**, v.120, p. 153-163, 1999. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/content/>>. Acesso em: 18 jun. 2012.

VENKATESH1, K. A. R. R.; BABURAO, N.; PADMAJA, G. Effect of auxins and auxin polar transport inhibitor (TIBA) on somatic embryogenesis in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **African Journal of Plant Science**, v.3, n.12, 2009. Disponível em: <<http://www.acadjourn.org/AJPS/PDF/Pdf2009/Dec/Venkatesh%20et%20al%20pdf.pdf>>. Acesso em: 18 jun. 2012.

VILAR, W. T. S.; MEDEIROS, E. P.; ALMEIDA, P. B. A.; SANTOS, M. B. H.; ALMEIDA, K. M. Uso da espectroscopia no infravermelho próximo para análise exploratória de torta de mamona detoxificada. In.: Congresso Norte Nordeste de Química, 4., 2011, Natal. **Anais eletrônicos...**Natal: UFRN, 2011. Disponível em: <<http://www.annq.org/congresso2011/arquivos/1300241206.pdf>>. Acesso em: 19 jun. 2012.

VOGEL, A. I.; MENDHAM, J.; DENNEY, R. C.; BARNES, J. D.; THOMAS, M. J. K. **Análise Química Quantitativa**, 6. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2002.

YANG, J.; YEN, H. E. Early salt stress effects on the changes in chemical composition in leaves of ice Plant and Arabidopsis: a Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study. **Plant Physiology**, v.130, p. 1032-1042, 2002. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/>>. Acesso em: 18 jun. 2012.

ZIMMERMANN, M. J. **Embriogênese somática**. In.: BARRUETO CID, L. P. **Cultivo in vitro de plantas**. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, p. 67-86, 2010.