



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ensaio de embriogénese somática e transformação genética em tamarilho (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.)

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Vegetal, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Jorge Manuel Pataca Leal Canhoto (Universidade de Coimbra) e da Doutora Sandra Isabel Marques Correia (Klón - Innovative Technologies from Cloning).

Ana Cristina da Silva Alves

2012

Aos meus pais, ao meu irmão e em memória da querida avó Ana.

Obrigada por me fazerem como sou!



Desenho a grafite feito pelo colega e amigo João Martins.

Imagem da capa: <http://www.tamarillo.co.uk/>

AGRADECIMENTOS

No final desta etapa não posso deixar de agradecer a todas as pessoas que me acompanharam ao longo deste último ano e, que de alguma forma, contribuíram para a realização e enriquecimento do trabalho aqui apresentado. Reconheço toda a vossa amizade, carinho e apoio de maneira a tornar mais fácil esta caminhada.

Em primeiro lugar agradeço profundamente aos meus orientadores por tudo o que me ensinaram durante este percurso, pela disponibilidade, pelo incentivo, pelo apoio e, principalmente, pela confiança que depositaram em mim. Ao meu orientador Professor Doutor Jorge Canhoto, pelo apoio científico, por toda a orientação, pela revisão, pela compreensão, simpatia e amizade com que me acompanhou ao longo de todo o trabalho. À Doutora Sandra Correia, minha co-orientadora, pelos ensinamentos, por toda a ajuda laboratorial, pela oportunidade de abordagem de novas técnicas, pela sua sempre presença, pela revisão de todo o texto e, sobre tudo, por toda a paciência, calma, amizade, boa disposição e incentivo.

À Dr.^a Ludovina Lopes pela colaboração e acompanhamento imprescindível no início deste trabalho.

À Doutora Paula Veríssimo e toda a sua equipa, por toda a ajuda na parte da proteómica, pela sua disponibilidade e simpatia.

À D. Eulália Rosa um agradecimento especial pela ajuda incondicional com o material no laboratório, pela atenção, por toda a amizade, pela força e pelo convívio durante este último ano.

Ao Sr. José Brasão pela realização dos cortes anatómicos.

À Lara, por todas as dicas ao longo do trabalho, principalmente pela ajuda com a técnica de Feulgen.

A todos os colegas de laboratório, ao João, ao Renato, à Patrícia, à Carla, à Ana, à Nélia, ao Gabriel, por toda a ajuda, boa disposição e convívio. Ao João, um agradecimento especial por toda a ajuda na elaboração deste trabalho, quer na prática, quer na escrita, por toda a amizade, companheirismo, compreensão e paciência.

Aos meus pais e ao meu irmão por todo o amor.

À minha família.

Muito obrigada.

ÍNDICE

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	xiii
1.1. Biotecnologia vegetal – princípios e aplicações.....	3
1.2. Tamarilho (<i>Cyphomandra betacea</i> (Cav.) Sendt.).....	7
1.2.1. Caracterização, distribuição e importância económica.....	7
1.2.2. Propagação e cultura <i>in vitro</i>	10
1.2.3. Embriogénese somática em tamarilho	11
1.2.4. Melhoramento do tamarilho	16
1.3. Objectivos	19
2. MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1. Material vegetal.....	22
2.2. Métodos	22
2.2.1. Estabelecimento <i>in vitro</i> de material proveniente de planta adulta.....	22
a) Cultura de segmentos nodais	22
b) Cultura de segmentos internodais.....	23
2.2.2. Caracterização da resposta de diferentes génotipos à indução de ES.....	25
a) Análise citogenética e morfológica dos diferentes génotipos.....	25
b) Indução de ES.....	26
2.2.3. Estabelecimento de suspensões celulares.....	28
a) Determinação da taxa de incremento em massa e optimização da razão <i>massa / volume</i>	28
b) Análise proteica de suspensões celulares obtidas de diferentes linhas de <i>calo</i>	29
2.2.4. Transformação genética de calo embriogénico.....	31
a) Estirpes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> e vector	31
b) Condições de co-cultura e selecção.....	32

c) Confirmação da transformação por PCR e análise da expressão da β -glucuronidase (GUS)	34
3. RESULTADOS	35
3.1. Estabelecimento <i>in vitro</i> de material proveniente de planta adulta.....	37
3.1.1. Cultura de segmentos nodais.....	37
3.1.2. Indução de calo a partir de secções internodais.....	38
3.2. Caracterização da resposta de diferentes genótipos à indução de ES	40
3.2.1. Caracterização citogenética e morfológica dos genótipos.....	40
3.2.2. Indução de ES	43
3.3. Estabelecimento de suspensões celulares.....	50
3.3.1. Determinação da taxa de incremento em massa e optimização da razão massa / volume.....	50
3.3.2. Análise proteica de suspensões celulares obtidas de diferentes linhas de calo.....	53
3.4. Transformação genética de calo embriogénico.....	55
3.4.1. Confirmação da electroporação.....	55
3.4.2. Transformação das linhas celulares de calo embriogénico	55
3.4.3. Confirmação da transformação por PCR e análise da expressão da β -glucuronidase.....	57
4. DISCUSSÃO	59
4.1. Estabelecimento <i>in vitro</i> de material proveniente de planta adulta.....	61
4.2. Caracterização da resposta de diferentes genótipos à indução de ES	63
4.3. Estabelecimento de suspensões celulares.....	67
4.4. Transformação genética de calo embriogénico.....	70
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	73
6. REFERÊNCIAS	77

RESUMO

O tamarilho (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt sin. *Solanum betaceum*), pertencente à família das solanáceas, é uma árvore que produz frutos comestíveis com elevado valor nutricional. Alguns estudos têm mostrado o interesse desta espécie para a compreensão de aspectos particulares da morfogénese *in vitro*, particularmente a embriogénese somática (ES). A ES tem demonstrado ser uma importante ferramenta na biotecnologia com um grande potencial para a rápida propagação de clones em larga-escala. Além disso, os procedimentos de transformação genética e criopreservação de muitas espécies vegetais, baseiam-se em protocolos eficazes de ES. Uma das formas de induzir ES no tamarilho consiste um processo em duas fases, no qual células embriogénicas são inicialmente induzidas num meio de cultura suplementado com uma auxina (fase de indução) e depois após a sua transferência para um meio de cultura desprovido de auxinas, desenvolvem-se embriões somáticos (fase de desenvolvimento). Vários tipos de explantes, com origem em material adulto ou previamente estabelecido *in vitro*, e várias condições de indução, têm sido testados para otimizar a resposta do tamarilho à indução de ES. Para superar o reduzido potencial de ES nos tecidos adultos, neste trabalho seguiu-se uma abordagem indirecta, na qual os rebentos de uma árvore adulta foram, primeiramente, estabelecidos *in vitro*, e uma abordagem directa, na qual se induziu ES em secções do caule de ramos jovens de tamarilho. De modo a otimizar o protocolo de indução de ES no tamarilho, precedeu-se à caracterização da resposta da indução de ES sob vários tipos de stresse, assim como face à indução de ES em diferentes genótipos, de plantas diploides e tetraploides, que foram previamente caracterizados citológica e morfológicamente. Os resultados demonstram que factores como o tipo de auxina, a concentração de sacarose, a presença de ácido ascórbico e o tempo de manutenção dos meios de cultura interferem na resposta à indução de ES.

Na indução de ES em tamarilho, células embriogénicas e células não embriogénicas surgem lado a lado nos mesmos explantes, o que se trata de uma condição ideal para avaliar as alterações moleculares e bioquímicas observadas nos diferentes tipos de calos. No trabalho realizado estabeleceu-se, pela primeira vez, um protocolo para a multiplicação de massas de células embriogénicas através do uso de suspensões celulares. O teste de várias massas de células e vários volumes de meio de cultura permitiram analisar a cinética de crescimento das células e otimizar a razão

massa de células / volume a utilizar em ensaios futuros. Além disso, analisaram-se os perfis proteicos das secreções dos dois tipos diferentes de células, sendo as secreções do tecido não embriogénico as que apresentam mais diversidade e quantidade de proteínas. Este tipo de análise pode ser utilizada para compreender a embriogénese numa perspectiva mais integradora.

Uma das muitas aplicações do calo embriogénico obtido por indução de ES é a transformação genética. Trabalhos anteriores para outras espécies têm demonstrado que as taxas mais elevadas de sucesso na transformação genética têm sido obtidas com este tipo de explante. Neste trabalho procurou-se estabelecer um protocolo de transformação genéticas de células embriogénicas, utilizando três estirpes diferentes de *Agrobacterium tumefaciens* possuindo o plasmídeo p35SGUSINT. A quantificação da massa de células resistentes à canamicina e os resultados da coloração do ensaio GUS indicaram a estirpe C58C1, como a mais eficiente na transformação de células embriogénicas do tamarilho, sendo, no entanto, necessária uma análise mais detalhada em trabalhos futuros.

A informação recolhida neste trabalho, nomeadamente com a análise comparativa da resposta de diferentes genótipos e com o desenvolvimento de um protocolo para a cultura de suspensões celulares, poderá contribuir para responder a alguns dos passos restritivos da ES e da transformação genética no tamarilho, para a qual os conhecimentos fundamentais sobre as plantas modelo tradicionais têm sido insuficientes. Encontrar as proteínas directamente envolvidas na aquisição de competência embriogénica poderá ajudar a compreender os mecanismos reguladores deste processo. Para além disso, o desenvolvimento de protocolos de transformação genética optimizados constitui um importante recurso, não apenas para o melhoramento da espécie, mas também como uma ferramenta da genómica funcional para a identificação e caracterização das vias moleculares envolvidas no processo de ES.

PALAVRAS-CHAVE

Agrobacterium tumefaciens; calo embriogénico; plantas tetraplóides; suspensões celulares; segmentos internodais.

ABSTRACT

Cyphomandra betacea (Cav.) Sendt (tamarillo) (syn. *Solanum betaceum*) is a small solanaceous tree which produces edible high nutritional fruits. Several lines of research have shown the interest of this species to understand particular aspects of *in vitro* morphogenesis, in particular somatic embryogenesis (SE). SE is an important biotechnological tool with great potential for rapid large-scale clone propagation. In addition, genetic transformation and cryopreservation procedures in many plant species rely on efficient SE protocols. One of the pathways to induce SE in tamarillo is a two-step process in which embryogenic tissues and non-embryogenic callus are first produced (induction phase) in an auxin-rich medium and then developed into embryos, following the transfer to an auxin-free medium (development phase). Several explants, with origin from an adult tree or from plants previously established *in vitro* have been tested in optimization assays of the SE induction protocol in tamarillo. To overcome the lack of potential of adult tissues for SE, an indirect approach was attempted, in which shoots from an adult tree were first established *in vitro*, and a direct approach, in which SE was intended to be induced from juvenile plant material (intermodal stem segments). To improve the induction protocol of SE in tamarillo several stress conditions were tested for different genotypes of diploid and tetraploid plants. These genotypes were previously characterized cytological and morphologically. The results have showed that different factors, such as the auxin kind, the sucrose concentration, the presence of ascorbic acid on the medium and the medium's maintenance time were crucial for the SE induction.

In tamarillo SE, embryogenic and non-embryogenic cells arise side by side from the same cultured explants, which is an ideal condition to evaluate molecular and biochemical changes occurring in the different types of *calli*. In this work, a protocol for the embryogenic cells multiplication through cell suspension culture was established for the first time. Several weights of cells and several culture media volumes were tested in order to evaluate the kinetic growth of the cell suspension and optimize the ratio weight/volume for future approaches. Furthermore, protein profiles were obtained from the secretions produced by embryogenic and non-embryogenic cells after the culture period. The profiles analysis showed that the non-embryogenic cells were the ones producing a higher protein diversity and quantity. This type of analysis can be extended to understand embryogenesis in a more integrated perspective.

One of the many applications for embryogenic tissue obtained by SE induction is its use for genetic transformation. Previous work with other species have reported the highest success levels achieved with this type of explant. In this work, the establishment of an efficient protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic cells, using three different strains carrying the p35SGUSINT plasmid, was for the first time attempted. The quantification of kanamycin resistance cells and the results obtained for the Gus staining assay indicated that C58C1 was the most efficient strain, nevertheless more detailed analysis are needed for future assays.

The information gathered in this work, with the comparative analysis of the responsiveness of different genotypes, under several culture conditions, and the development of a cell suspension culture protocol, can contribute to answer to some of the limiting steps of SE in tamarillo, to which fundamental knowledge from the classical model plants has been insufficient. Finding proteins directly involved in the acquisition of embryogenic competence may help to understand the regulatory mechanisms of this process. Furthermore, the development of optimized transformation protocols is critical, not only for the species improvement, but also for functional genomics approaches that would allow to better understand the molecular pathways involved in SE.

KEY WORDS

Agrobacterium tumefaciens; cell suspension culture; embryogenic *callus*; internodal stem segments; tetraploid plants.

1. INTRODUÇÃO



1.1. Biotecnologia vegetal – princípios e aplicações

Em 2009, segundo dados da FAO (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação) o número de pessoas com fome no nosso planeta ultrapassou os mil milhões de habitantes (www.fao.org). Por comparação destes dados com os de 2006, onde o número rondava os 800 milhões, com tendência a diminuir, nota-se que houve um grande aumento no número de pessoas que não conseguem ter uma alimentação condigna.

Das cerca de três mil espécies vegetais que, ao longo dos tempos, têm sido utilizadas pela espécie humana na sua alimentação, são cerca de vinte aquelas que são na realidade importantes, sendo metade destas cereais (Chrispeels e Sadava, 2003). Com o aumento contínuo da população, a diminuição da área de solos agrícolas e a elevação dos padrões de vida em alguns países em vias de desenvolvimento, acentuam-se as preocupações relativas ao agravamento das necessidades alimentares da espécie humana e ao facto de os métodos de melhoramento convencionais poderem não suportar o aumento requerido de bens alimentares (Irninger, 2003).

No decorrer dos últimos anos, um vasto número de metodologias tem vindo a ser desenvolvido, oferecendo vantagens significativas em termos do avanço do conhecimento na área das ciências botânicas, e cuja exploração contribui para o melhoramento das colheitas. Tais metodologias incluem-se na área da Biotecnologia, uma combinação de ciência básica e tecnologia, resultante da integração das ciências da vida e da engenharia, e que tem como objectivo o desenvolvimento de novos produtos, com base nas potencialidades dos organismos, suas células ou mesmo organitos, para fins práticos ou industriais (Chawla, 2010). Deste modo, considerando particularmente a Biotecnologia Vegetal, esta refere-se à manipulação de plantas para a obtenção de novas características ou à sua utilização para a obtenção de determinados produtos ou realização de determinadas funções (Canhoto, 2010). Inclui tecnologias emergentes, resultantes de avanços da Genética e da Biologia Molecular, e está directamente relacionada com áreas de investigação, cujos objectivos passam por elucidar os aspectos moleculares do desenvolvimento e da morfogénese (Trigiano e Gray, 2005).

Na vasta área da Biotecnologia Vegetal inclui-se a cultura *in vitro*, que diz respeito ao estabelecimento e manutenção, em condições laboratoriais, de células, tecidos, órgãos vegetais, plantas ou massas de células (*callus*), vulgarmente designadas por calos (Loyola-Vargas e Vázquez-Flota, 2006; Chawla, 2010). Estas culturas são

mantidas em condições assépticas e perfeitamente controladas - luz, temperatura, pH, humidade, composição do meio de cultura (Canhoto, 1994), de forma a evitar contaminações por microrganismos, e podem ser utilizadas com diversas finalidades. Dos principais objectivos desta técnica destacam-se: i) a micropropagação de plantas, ii) a produção de metabolitos secundários, iii) a transformação genética, iv) a fusão de protoplastos e v) a obtenção de plantas haplóides (Canhoto, 2010).

A micropropagação de plantas constituiu a primeira aplicação, a nível industrial, da tecnologia de cultura *in vitro*. Embora Haberlandt, em 1902, tenha introduzido o conceito de totipotência, só mais tarde com Gautheret (1939), e após a descoberta da auxina ácido 3-indolacético (IAA) por Went (1926), foi possível cultivar células indiferenciadas por períodos longos através de subculturas sucessivas (Chawla, 2010). A descoberta das hormonas vegetais foi, portanto, um passo impulsionador para a realização de estudos com o objectivo de compreender os mecanismos de controlo do crescimento e desenvolvimento vegetais (Pais, 2003).

Foi assim que, a partir da década de 50, a cultura *in vitro*, particularmente a cultura de meristemas apicais caulinares, passou a ser utilizada para a produção de plantas em larga escala, de modo a dimensionar e ajustar os tempos de produção, independentemente da disponibilidade de campo e das condições edafoclimáticas adequadas, permitindo a sua colocação no mercado, de acordo com as exigências do consumidor. Ainda na década de 50, Steward *et al.*, (1958) e Reinert (1958), de forma independente, demonstraram a totipotência das células vegetais, ao verificarem a formação de embriões somáticos e regeneração de plantas a partir de células diferenciadas de raiz de cenoura (*Daucus carota*). Esta constatação levou a considerar que nem mesmo as células diferenciadas das plantas estão irreversivelmente direccionadas para um determinado padrão de desenvolvimento (Chawla, 2010), e que o programa genético para a embriogénese permanece contido no interior das células podendo ser reprogramado (Zimmerman, 1993).

Na cultura de plantas *in vitro* é frequente a formação de calo que pode ter a capacidade de regeneração de plantas por organogénese ou embriogénese somática (Loyola-Vargas e Vázquez-Flota, 2006). Contudo, estes calos podem também ser utilizados com outras finalidades como a análise do crescimento celular, a produção de biomassa ou para a extracção de determinados metabolitos (Robledo-Paz *et al.*, 2006). Quando o calo é colocado em cultura em meio sólido, as suas células ao dividirem tendem a ficar agrupadas, formando pequenos aglomerados. No entanto, se estes calos

forem transferidos para um meio de cultura líquido, as células tendem a separar-se umas das outras, ficando livres ou formando pequenas massas celulares (Loyola-Vargas e Vázquez-Flota, 2006; Chawla, 2010). É a esta população de células isoladas, ou em pequenos aglomerados, que se denomina suspensão celular, uma forma mais conveniente para a extracção em grande escala de metabolitos e para estudos a nível celular e molecular (Mustafa *et al.*, 2011). Nestas condições, as células são crescidas em agitação, permitindo uma melhor oxigenação, o que evita a agregação celular (Chawla, 2010), e permite uma melhor distribuição celular pelo meio, facilitando também o contacto com os nutrientes (Canhoto, 2010).

Uma suspensão celular vegetal apresenta uma dinâmica de crescimento semelhante ao crescimento de outras populações celulares, como por exemplo uma população bacteriana, diferindo no tempo de duplicação, sendo este muito maior no caso das plantas (Robledo-Paz *et al.*, 2006). Numa fase inicial – fase *lag*, na qual as células se preparam para sofrerem divisão, a população celular mantém-se mais ou menos constante. A fase seguinte – fase exponencial, é onde a taxa de divisão celular é mais elevada, seguindo-se uma fase linear, onde há uma diminuição da divisão celular, mas um aumento da taxa de expansão celular. Na fase de desaceleração ocorre uma diminuição das taxas de divisão e alongamento celular e, por fim, quando um factor se torna limitante, entra-se na fase estacionária em que o número e o tamanho das células se mantêm constantes. Quando alcançada esta fase, deve proceder-se à renovação do meio ou ao estabelecimento de subculturas para assegurar a continuação do crescimento (Robledo-Paz *et al.*, 2006; Chawla, 2010).

A micropropagação de plantas não é mais que um processo de clonagem, na medida em que se procede à multiplicação de indivíduos geneticamente iguais ao que lhes deu origem. Este procedimento é possível devido à capacidade das plantas de regenerar rebentos e novas plantas a partir de tecidos somáticos. Na cultura *in vitro*, a regeneração de plantas, para objectivos de micropropagação, pode ocorrer por três processos (Chawla, 2010): i) proliferação de meristemas apicais do caule ou axilares, ii) neoformação de gemas (organogénese) e iii) produção de embriões somáticos (embriogénese somática).

A embriogénese somática pode considerar-se um tipo particular de micropropagação a partir de células, ou estruturas somáticas, tais como embriões imaturos ou maduros ou os seus componentes, explantes de diferentes órgãos da planta,

protoplastos e células em suspensão. Estes explantes, em condições de cultura apropriadas, originam embriões somáticos, que passam pelas mesmas fases de desenvolvimento dos zigóticos (Umehara e Kamada, 2005; Jiménez, 2005;). A capacidade de produzir, a partir de células em cultura, embriões morfológica e fisiologicamente normais, através do processo de embriogénese somática, é uma capacidade única dos organismos do Reino Vegetal (Zimmerman, 1993), baseada na totipotência das suas células (Figuerola *et al.*, 2006).

O estudo do desenvolvimento embrionário num grande número de gimnospérmicas e angiospérmicas impulsionou os estudos da embriologia experimental, que procura determinar os factores físicos, fisiológicos, bioquímicos e genéticos envolvidos no controlo dos processos embriogénicos. Para a concretização destes estudos, a contribuição da técnica da cultura de tecidos e da descoberta da embriogénese somática tem sido valiosa (Robledo-Paz *et al.*, 2006).

A vantagem oferecida pelos métodos de propagação *in vitro*, relativamente aos métodos convencionais, é a produção de um grande número de plantas, a partir de um único indivíduo, num período de tempo relativamente curto. Quando comparadas com as plantas propagadas por semente, as plantas micropropagadas apresentam, em regra, maior vigor, qualidade mais uniforme e crescimento e maturação mais rápidos (Pais, 2003). Para além disso, a qualidade fitossanitária destas plantas é superior à daquelas obtidas por outros métodos (Hartmann *et al.*, 1997). Estas técnicas são de grande utilidade na clonagem de genótipos seleccionados e permitem a produção, em grande escala, de uma forma mais rápida do que a resultante de reprodução sexuada ou da aplicação de técnicas convencionais de propagação (Hartmann *et al.*, 1997).

No entanto, embora a micropropagação apareça como uma tecnologia importante na multiplicação de plantas lenhosas, apresenta algumas limitações, tais como o facto de ser, em certos casos, um processo muito moroso, que requer um forte investimento laboratorial, tornando o produto final mais caro que as plantas produzidas por métodos convencionais de propagação. Algumas estratégias podem, contudo, ser adoptadas, nomeadamente a sua aplicação a espécies de valor acrescentado, a robotização do processo ou o desenvolvimento e optimização de sistemas mais eficientes e, conseqüentemente, mais económicos (Kane, 2005).

O aperfeiçoamento destas novas tecnologias, nomeadamente com recurso a sistemas-modelo, e a sua aplicação ao desenvolvimento de sistemas optimizados de

propagação vegetal apresenta-se como uma área com inúmeras potencialidades e possibilidades de exploração científica e socioeconómica.

Entre as espécies com potencial económico surge o tamarilho, uma planta utilizada pelo Homem desde há muitos anos (Correia *et al.*, 2008; 2011). Esta espécie encontra-se incluída no que se convencionou chamar de NUC's (Neglected or Underutilized Crops), o que significa que se trata de uma espécie com potencial para ser utilizada na prática agrícola mas que, por alguma razão, não tem sido devidamente explorada (Global Facilitation Unit for Underutilized Species, www.underutilized-species.org). Se por um lado, se notam baixos níveis de produção e consumo de tamarilho, por outro, os seus frutos têm-se mostrado bastante rentáveis, atingindo elevados preços no mercado (20-35 €/Kg). Como consequência, torna-se importante aumentar a sua produção, quer em termos quantitativos, quer qualitativos.

Além disso, o tamarilho surge também como um importante sistema de referência para a optimização de protocolos de cultura *in vitro* e estudos de biologia do desenvolvimento de lenhosas (Correia *et al.*, 2012).

1.2. Tamarilho (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.)

1.2.1. Caracterização, distribuição e importância económica

Cyphomandra betacea (Cav.) Sendt. (sin. *Solanum betaceum*), é uma solanácea, vulgarmente conhecida como tamarilho, “tamarillo”, “tree tomato” ou “tomate de la paz” (Bois, 1927). A designação tamarilho surgiu em 1967, na Nova Zelândia, depois de um rápido aumento da produção e consumo deste fruto, que levou à necessidade da existência de um nome comercialmente apelativo que não fosse confundido com o vulgar tomate (*Lycopersicon esculentum*, agora *Solanum lycopersicum*) da mesma família do tamarilho (Morton, 1987).

Trata-se de um arbusto subtropical pequeno (Fig. 1A), semi-lenhoso e de rápido crescimento, que pode atingir até 5m de altura (Canhoto *et al.*, 2005). As flores aparecem desde os meados da Primavera até aos meados do Verão, são rosa-esbranquiçadas (Fig. 1B) e surgem agrupadas próximo dos pecíolos das folhas (Correia

INTRODUÇÃO

et al., 2008). A polinização é principalmente autogâmica, o que pode explicar para a baixa variabilidade observada em populações naturais desta espécie (Barghchi, 1986). Os frutos são ovados, lisos, pendentes da planta por um longo pedúnculo, têm normalmente 5-7 cm de comprimento (Fig. 1B e 1C) e podem ser vermelhos (Fig. 1C), laranja ou amarelos, dependendo do cultivar. No entanto, são os frutos vermelhos os mais apreciados pelo seu sabor e aroma mais intensos (Correia *et al.*, 2008). O epicarpo é um pouco rígido e de sabor desagradável, já o mesocarpo é ligeiramente compacto, suculento e suave. A polpa é macia, sumarenta e ligeiramente ácida, podendo o grau de acidez variar consoante os diferentes cultivares (Morton, 1982; Mertz *et al.*, 2009). As sementes são planas e arredondadas e podem ser ingeridas juntamente com o endocarpo (Correia, 2011).



Figura 1. *Cyphomandra betacea*. (A) – Árvore de tamarilho com cerca de 13 anos *sita* no Jardim Botânico da Universidade de Coimbra. (B) – Flores e frutos em diferentes estados de desenvolvimento. (C) – Frutos maduros, a linha corresponde a 1cm.

Esta espécie é nativa da região dos Andes, na América do Sul, Perú, Chile, Bolívia e Argentina (Canhoto *et al.*, 2005; Correia *et al.*, 2008, 2011), onde cresce entre os 1100 a 2300 m de altitude. Começou a ser domesticada e cultivada ainda antes da descoberta da América e, pouco tempo depois, o seu cultivo começou a ser alargado para outras áreas sub-tropicais, como a Índia e o Sudeste Asiático e, presume-se, que tenha sido introduzido nos Açores e Madeira no século XIX (Guimarães *et al.*, 1996; Canhoto *et al.*, 2005). No entanto, só recentemente se tem generalizado o interesse por esta espécie, nomeadamente pela procura dos seus frutos.

Hoje em dia, para além dos locais onde a espécie é espontânea, o tamarilho é maioritariamente cultivado no Brasil, Colômbia, Venezuela, Equador, E.U.A. (Califórnia), Portugal, Quênia, Índia, Indonésia e Austrália (Mertz *et al.*, 2009). Actualmente, o principal produtor e exportador dos frutos do tamarilho é a Nova Zelândia, tendo como base um programa de melhoramento e selecção, desenvolvido desde os anos 50 do século XX (Meadows, 2002).

Trata-se de uma espécie adaptável e de fácil cultivo, com um ciclo de reprodução curto e com um tempo médio de vida de 8 anos. A frutificação inicia-se, normalmente, 2 anos após o cultivo e o clímax de produção é atingido em 5 anos, começando a haver um declínio da produção de frutos após 6 anos de cultivo. (Meadows, 2002). A baixa tolerância à geada e a sensibilidade a temperaturas constantemente elevadas, a secas prolongadas e a solos inundados são outras limitações ao cultivo do tamarilho (Lopes *et al.*, 2000).

O tamarilho é normalmente cultivado devido ao interesse nos seus frutos, que quando maduros podem ter vários usos alimentares, desde saladas a produtos processados, como sumos ou compotas. Em Portugal, o tamarilho é cultivado principalmente nas ilhas atlânticas, mas tem já despertado o interesse de alguns agricultores do continente (Guimarães *et al.*, 1996). Em termos de valores nutricionais, os frutos do tamarilho têm um teor relativamente elevado de proteínas (1,5-2 g / 100 g), vitamina C (20-45 mg / 100 g), vitamina E (1,86 mg / 100 g), provitamina A e também alguns minerais como ferro e potássio. Para além disto, o teor em hidratos de carbono é reduzido (7,7 g / 100 g), assim como o seu valor calórico (cerca de 28 cal / 100 g) (McCane e Widdowson, 1992). Recentemente, vários estudos têm sido realizados para a avaliação do teor e tipo de antocianinas e carotenóides presentes nos frutos do tamarilho (de Rosso e Mercadante, 2007; Kou *et al.*, 2008; Hurtado *et al.*, 2009). Os resultados têm mostrado que alguns destes componentes podem ter propriedades antioxidantes,

terapêuticas e preventivas importantes, tornando os frutos uma fonte de alimento que merece uma melhor exploração.

1.2.2. Propagação e cultura in vitro

A propagação dos cultivares de tamarilho pode ser feita através de sementes ou estacas (Prohens e Nuez, 2001). Ainda que as sementes germinem facilmente, não asseguram uniformidade genética e não têm utilidade quando o objectivo é a propagação de genótipos seleccionados. Neste caso, têm que ser usados métodos de propagação assexual. A baixa taxa de polinização cruzada e a elevada incidência de fenómenos de incompatibilidade dentro desta espécie, associados aos problemas fitossanitários (Mossop, 1977), têm tornado inadequado o uso das técnicas tradicionais para o melhoramento dos cultivares de tamarilho. Assim, métodos de biotecnologia, como a clonagem *in vitro* e a transformação genética, surgem como ferramentas úteis para o melhoramento de plantas como o tamarilho (Barghchi, 1998).

Foram já publicados vários ensaios que descrevem a micropropagação do tamarilho através da proliferação de meristemas axilares (Cohen e Elliot, 1979; Barghchi, 1998; Obando *et al.*, 1992), de organogénese (Guimarães *et al.*, 1996; Obando e Jordan, 2001) e de embriogénese somática (Guimarães *et al.*, 1988, 1996; Lopes *et al.*, 2000; Canhoto *et al.*, 2005; Correia *et al.*, 2009, 2011, 2012b). No entanto, o primeiro método a ser aplicado para a micropropagação do tamarilho foi a proliferação dos meristemas axilares (Barghchi, 1986; Cohen e Elliot, 1979). Mais tarde, foi conseguida a regeneração da planta por organogénese em explantes foliares (Obando *et al.*, 1992) e através de protoplastos (Tomé *et al.*, 1992). Mais recentemente, a micropropagação de plantas de tamarilho através da formação de gomos adventícios na página abaxial de explantes foliares e a sua multiplicação também foi conseguida (Obando e Jordan, 2001; Gatita e Almeida, 2003), e em 1998 Barghchi induziu calo a partir de pólen num meio suplementado com benziladenina (BA), não conseguindo, no entanto, obter plantas haplóides.

No final dos anos 80 do século passado, Guimarães *et al.*, (1988) descreveram, pela primeira vez, a indução da embriogénese somática (ES) através da cultura de hipocótilos e embriões zigóticos maduros. Em estudos subsequentes, foi referida a obtenção de plantas de tamarilho por organogénese, e por ES a partir de diferentes explantes (hipocótilos, cotilédones, raízes e embriões zigóticos maduros) e a partir de

protoplastos (Guimarães *et al.*, 1996). Nesta linha de trabalhos foram iniciadas culturas a partir de embriões zigóticos e de diferentes órgãos de plântulas com 3 semanas mantidas assepticamente, de discos de folhas e de segmentos de pecíolo. Foi também observada a indução e regeneração de rebentos a partir de hipocólitos, cotilédones e explantes radiculares em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) contendo BA, tendo o enraizamento sido conseguido com tratamentos com ácido 3-indol butírico (IBA). Da análise do número de cromossomas das células da ponta da raiz de plantas regeneradas, quer por organogénese quer por ES, verificou-se que este corresponde ao conjunto normal diplóide ($2n=24$). Contudo, foram encontradas algumas anomalias quanto ao número de cromossomas em plantas provenientes de culturas de calo embriogénico com mais de 2 anos (Canhoto *et al.*, 2005).

1.2.3. Embriogénese somática em tamarilho

Em condições naturais, o embrião resulta do processo de reprodução sexuada, no qual dois gâmetas se fundem formando uma nova entidade – o zigoto, que através de sucessivas divisões e da subsequente especialização celular vai originar o embrião. Em condições experimentais, também podem ser produzidos embriões com origem em células do corpo (*soma*). Estes, vulgarmente designados “somáticos” são, como os zigóticos, estruturas bipolares com um pólo radicular e um caulinar, possuem o mesmo genótipo da planta mãe e são, na maioria dos casos, morfológicamente semelhantes aos embriões zigóticos produzidos pela mesma espécie (Canhoto, 2010).

Desde 1988, têm sido estudados diferentes aspectos relacionados com a indução de ES e o desenvolvimento de embriões somáticos de tamarilho no nosso laboratório (Guimarães *et al.*, 1988, 1996; Lopes *et al.*, 2000; Canhoto *et al.*, 2005; Correia *et al.*, 2009, 2011, 2012b), procurando um modelo para a compreensão dos mecanismos moleculares e citológicos envolvidos na formação e desenvolvimento de embriões somáticos (Correia *et al.*, 2012a), sendo este um processo morfogénico com aplicações importantes não só para a clonagem de plantas e a transformação genética, mas também para compreender melhor a formação e desenvolvimento do embrião (Correia, 2011).

São vários os explantes de tamarilho que têm potencial para a iniciação de culturas embriogénicas, incluindo embriões zigóticos, folhas jovens, cotilédones e hipocótilos (Fig. 2). Um aspecto frequentemente referido na literatura diz respeito à recalitrância de material adulto para a indução de ES em algumas espécies,

principalmente de árvores (Thorpe e Stasolla, 2001), limitando assim a clonagem de plantas seleccionadas. Uma forma alternativa de clonar tamarilho adulto por ES passa pelo estabelecimento prévio *in vitro* de plantas, através da proliferação de meristemas axilares, seguido da indução de embriogénese em segmentos foliares provenientes das plantas estabelecidas (Correia *et al.*, 2011).

Como já foi referido anteriormente, a indução de ES é alcançada com um meio de cultura rico em auxinas suplementado com elevados níveis de sacarose (9%), o que aumenta significativamente a formação de embriões somáticos, aumentando a eficiência da indução de ES para valores próximos dos 85% (Canhoto *et al.*, 2005). Os embriões zigóticos de tamarilho foram os primeiros explantes testados para a indução de ES nesta espécie, ocorrendo a formação de embriões somáticos através de duas vias diferentes, dependendo do tipo de auxina utilizada – ácido 1-naftaleno acético (NAA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) ou picloram (Fig. 3A). Assim, na presença de NAA os embriões somáticos desenvolvem-se a partir de tecidos dos embriões zigóticos, com uma formação reduzida de calo – processo “one step”. Por sua vez, quando são usadas outras auxinas, como o 2,4-D ou o picloram, os embriões zigóticos ou os explantes foliares produzem um tecido embriogénico possível de ser mantido, através de subculturas sucessivas no mesmo meio com auxina, e que começa a formar embriões e, mais tarde plantas, quando transferido para um meio sem auxinas – processo “two step”.

No processo “one-step” a indução e a maturação dos embriões somáticos é feita no mesmo meio de cultura (Guimarães *et al.*, 1996), tendo esta via sido já descrita para outras espécies lenhosas estudadas no nosso laboratório como a *Feijoa sellowiana* (Canhoto e Cruz, 1996, Correia e Canhoto, 2010), *Myrtus communis* (Canhoto, *et al.*, 1999) e *Ceratonia siliqua* (Canhoto *et al.*, 2006).

Durante os ensaios de ES, análises de microscopia electrónica de transmissão (TEM) e de varrimento (SEM) revelaram que, nas culturas de hipocótilos, na presença de NAA, os embriões somáticos desenvolvem-se a partir de uma camada meristemática, provavelmente de origem multicelular, num processo semelhante à diferenciação de embriões somáticos em *Feijoa sellowiana* (Canhoto e Cruz, 1996). Por outro lado, na presença de 2,4-D, a divisão celular começa próximo dos feixes vasculares levando à formação de calo (Guimarães *et al.*, 1996). As células epidérmicas e subepidérmicas adquirem também características meristemáticas, levando à formação de uma camada contínua de densas células citoplasmáticas na periferia deste calo.

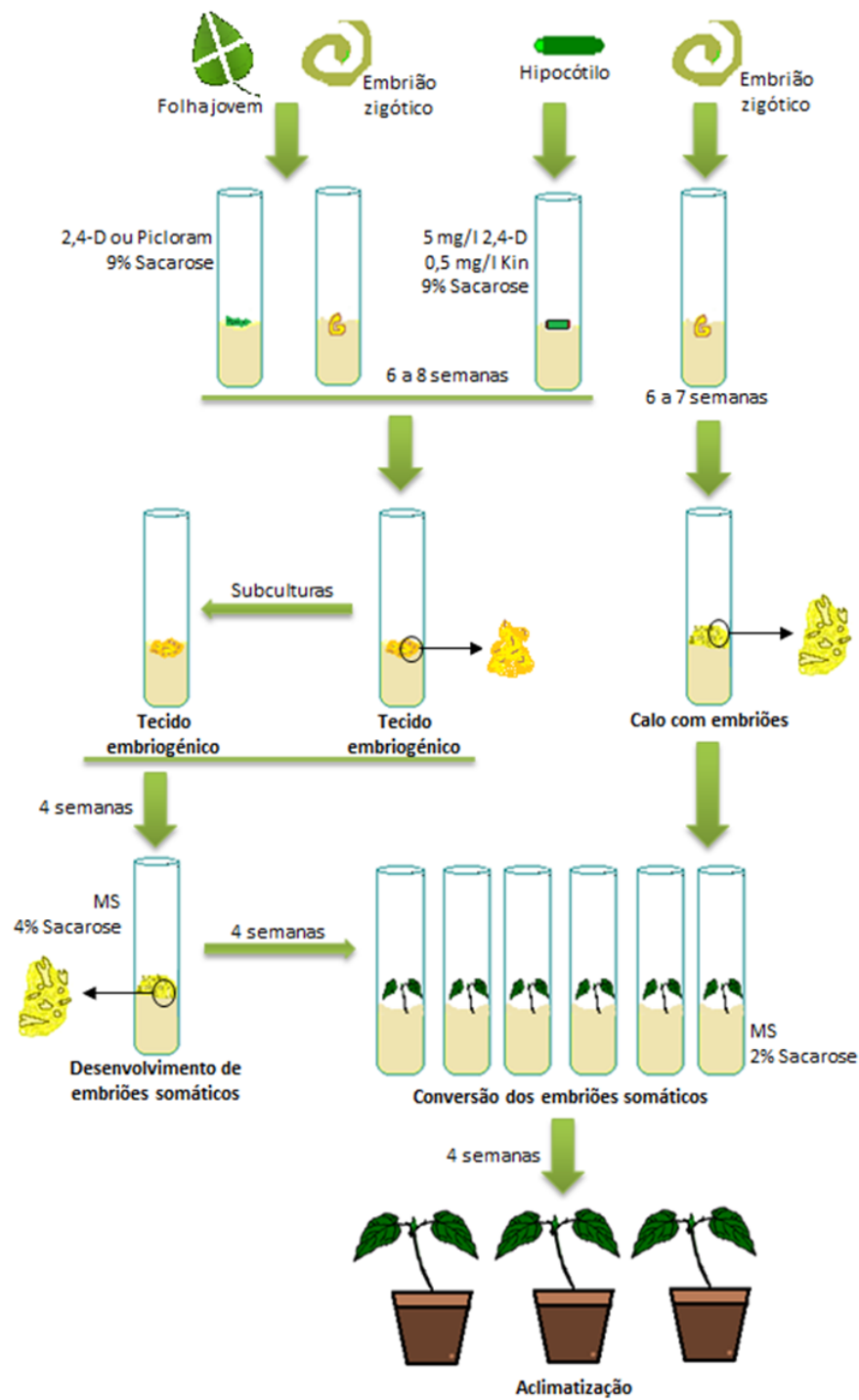


Figura 2. Representação esquemática do protocolo de indução de embriogênese somática no tamarilho (adaptado de Canhoto *et al.*, 2005).

Algumas destas células possuem capacidade para se organizarem em massas proembriogênicas que continuam a proliferar, dando origem a novas massas de tecido embriogênico através de divisões das células mais periféricas (Guimarães *et al.*, 1996).

INTRODUÇÃO

Estudos histoquímicos revelaram que o amido, no início da cultura, é muito abundante em quase todas as células da folha, no entanto a sua abundância nas células decresce à medida que ocorre a formação de calo. Já nos embriões zigóticos são os lípidos e as proteínas a principal fonte de reserva celular, no entanto também gradualmente desaparecem aquando a formação de calo (Lopes *et al.*, 2000).

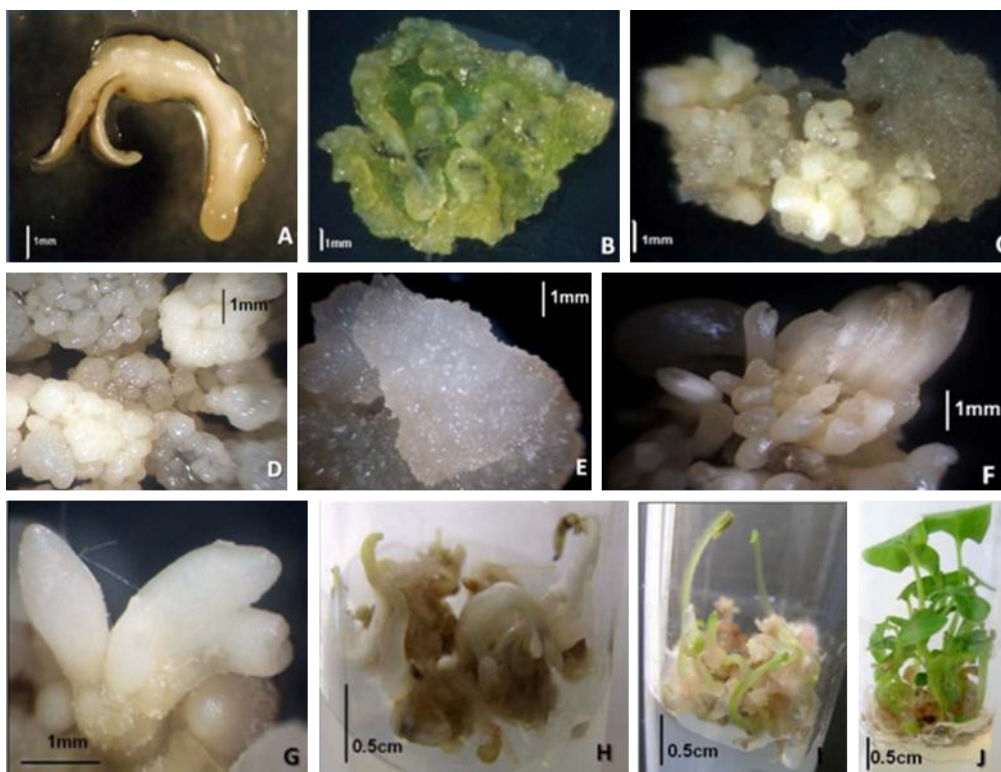


Figura 3. Embriogénese somática no tamarilho. **(A)** – Embrião zigótico após duas semanas em cultura em meio com 2,4-D. **(B)** – Explante foliar após um mês de indução em meio MS suplementado com picloram **(C)** – Áreas embriogénicas e não-embriogénicas (mais escuras) formadas a partir de um explante foliar após 10 a 12 semanas em cultura. **(D)** – Tecido embriogénico. **(E)** – Tecido não embriogénico. **(F)** e **(G)** Embriões somáticos em diferentes estados de desenvolvimento depois de 3 semanas em meio MS sem auxinas. Notar em **(G)** a morfologia anómala dos embriões, mostrando a fusão dos cotilédones. **(H-J)** – Conversão de embriões somáticos e desenvolvimento de plântulas após 6 semanas em meio MS (Correia, 2011).

A formação de tecido embriogénico oferece um grande potencial para a produção em larga escala (e.g. Godoy-Hernández e Vázquez-Flota, 2006) e a possibilidade de ser usado como fonte de linhas celulares para ensaios ou para a

transformação genética de plantas. O calo embriogénico de tamarilho pode ser mantido *in vitro* num meio com auxina, por vários anos, sem a perda do seu potencial embriogénico. Contudo, algumas linhas deste calo embriogénico são um pouco instáveis em cultura e, foram já detectadas variações no número de cromossomas e na quantidade de DNA. Análises RAPD mostraram polimorfismos entre calos embriogénicos com a mesma origem (Lopes *et al.*, 2000). As anomalias cromossómicas, incluindo a ocorrência de plantas tetraplóides, foram detectadas através da contagem de cromossomas (Lopes *et al.*, 2000). Estudos no nosso laboratório também mostraram que as plantas obtidas a partir de calo embriogénico com cerca de 5 anos exibem mais anomalias que aquelas regeneradas de calo recente – menos de um ano. Os dados obtidos parecem indicar que as anomalias cromossómicas ocorrem durante a cultura e não são pré-existentes nos tecidos cultivados. Foram também observadas diferenças na taxa de multiplicação entre várias linhas de calo tecido embriogénico e entre vários cultivares (Canhoto *et al.*, 2005).

Independentemente das condições testadas e da origem do explante, o tecido embriogénico não se desenvolve em embriões em meio com auxina. O desenvolvimento do embrião só ocorre quando as massas de tecido embriogénico, originado a partir de folhas ou embriões zigóticos, são transferidas para um meio sem auxina contendo menores concentrações de sacarose. As primeiras fases do desenvolvimento dos embriões somáticos podem ser observadas na superfície do calo com 3 semanas. Este desenvolvimento é um processo assíncrono, onde as diferentes fases morfológicas da maior parte dos embriões somáticos são semelhantes às que ocorrem durante a embriogénese zigótica – globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar. Nos embriões somáticos morfolologicamente semelhantes aos zigóticos, está também normalmente presente uma estrutura tipo suspensor (Canhoto *et al.*, 2009; Correia e Canhoto, 2010).

O desenvolvimento assíncrono dos embriões, a contínua proliferação de calo e a presença de embriões anómalos (Fig. 3G) tornam difícil estabelecer um método eficiente de quantificação para avaliar a regeneração de plantas através da ES. Todavia, ensaios na conversão e germinação de embriões somáticos têm sido conduzidos, para que haja uma redução de alguns destes problemas e um aumento das taxas de plantas regeneradas. Dados recentes demonstram que a manipulação das condições de luminosidade e a inclusão de ácido abscísico (ABA) no meio, antes da germinação, aumenta o número de embriões somáticos morfolologicamente normais produzidos (Correia *et al.*, 2011b).

Depois da conversão em plantas (Fig. 3J), estas são submetidas a uma etapa de aclimatização na estufa antes da sua passagem para o campo. Trabalhos anteriores revelaram que no desenvolvimento de plantas com anomalias morfológicas, após algum crescimento, estas recuperam o fenótipo normal. Os elevados níveis de mortalidade observados durante a fase de aclimatização nestes ensaios parecem relacionar-se com o anormal desenvolvimento das plantas (Canhoto *et al.*, 2005).

Desde que as condições para a indução de ES e regeneração de plantas se encontram bem caracterizadas no tamarilho, podem ser realizados estudos bioquímicos e moleculares para melhor compreender este processo morfogénico. Algumas vantagens desta espécie para este propósito são: i) a possibilidade de induzir ES a partir de vários órgãos como embriões zigóticos, hipocótilos ou folhas, ii) o calo embriogénico pode ser mantido em cultura por longos períodos de tempo sem que haja perda do potencial embriogénico, iii) a conversão de embriões somáticos em plantas é fácil e podem ser obtidas várias plantas a partir de um só calo, iv) a ES pode ser induzida em explantes derivados de árvores adultas, e v) podem ser obtidas linhas de células embriogénicas e não-embriogénicas a partir do mesmo explante, possuindo por isso o mesmo genótipo.

1.2.4. Melhoramento do tamarilho

A engenharia genética de plantas cultivadas está a criar uma nova era na agricultura, sendo o potencial do melhoramento genético um dos grandes interesses para os produtores de árvores de fruto. As variedades mais comercializadas são propagadas vegetativamente e os híbridos, de origem desconhecida, têm sido seleccionados pelos produtores e não podem ser melhorados pelos métodos tradicionais devido à sua elevada heterozigotia. Mesmo quando os métodos tradicionais de melhoramento são eficientes para um determinado cultivar, há sempre o obstáculo do longo período de tempo entre as diferentes gerações. A engenharia genética poderá permitir a inserção de genes específicos no genoma dos diferentes cultivares, acrescentando traços desejáveis sem afectar as características existentes (Cervera *et al.*, 1998).

A manipulação do genoma das plantas através da introdução de genes estranhos tem como objectivos o aumento da produtividade, conferindo resistência a stresses bióticos e abióticos, assim como a realização de estudos fundamentais como a identificação e caracterização de genes reguladores. Os métodos mais utilizados para a

transformação de plantas são a transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Fig. 5), o bombardeamento de microprojectéis ou microinjecção e a electroporação de cloroplastos (Sharma *et al.*, 2009). No entanto, o primeiro é o método mais usado, requerendo contudo procedimentos eficientes para que haja a supressão da bactéria para a posterior co-cultura e, subsequentemente, para a selecção das células transformadas (Surekha *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2009; Canhoto, 2010; Vidal *et al.*, 2010; Varghese e Bhat, 2011).

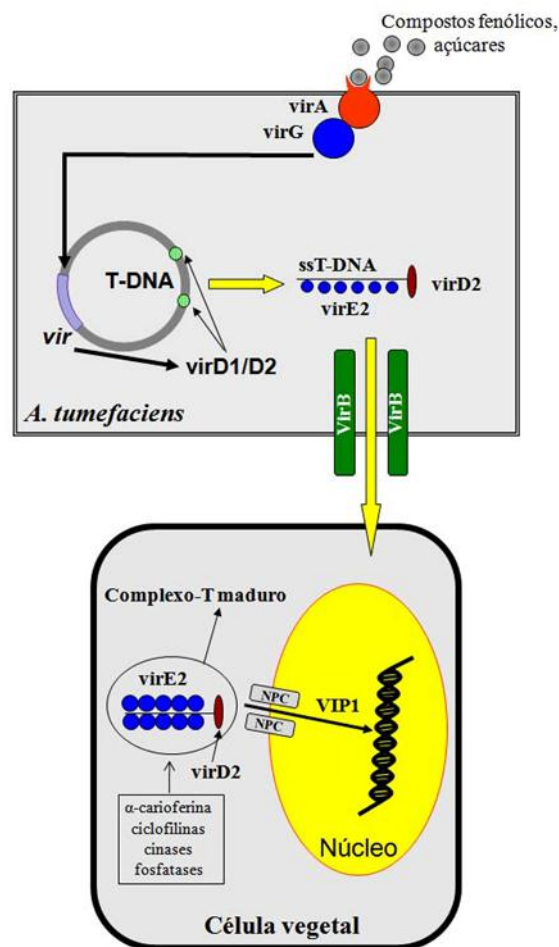


Figura 4. Infecção de células vegetais por *Agrobacterium tumefaciens* (Canhoto, 2010).

Trabalhos com o objectivo de obter plantas de tamarilho geneticamente modificadas foram descritos por Atkinson e Gardner (1993), Cohen *et al.*, (2000) e Cruz e Tomé (2007). Atkinson e Gardner (1993) descreveram a aplicação da transformação mediada por *Agrobacterium* como método para a obtenção de plantas geneticamente modificadas de tamarilhos via organogénese. Nesse trabalho, foi usada a estirpe

avirulenta LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* para a introdução do vector binário pKIWI110 em explantes foliares. Todas as plantas regeneradas eram resistentes à canamicina, expressando algumas também o gene repórter da β -D-Glucoronidase (*gusA*).

Mais recentemente, a transformação mediada por *Agrobacterium* foi usada para a obtenção de plantas de tamarilho resistentes ao TaMV (vírus do mosaico do tamarilho) regeneradas por proliferação de meristemas axilares (Choen *et al.*, 2000).

Considerando a importância económica, assim como as limitações de cultivo acima apresentadas para esta espécie, assume particular relevância a selecção de variedades cujas características sejam comercialmente mais vantajosas (Mertz *et al.*, 2009). Como tal, é desejável a obtenção de plantas que produzam uma maior quantidade de frutos, mais saborosos e de maiores dimensões, e ainda, maiores quantidades de substâncias que possam ter aplicações industriais, farmacêuticas ou medicinais. É igualmente desejável uma melhoria da capacidade de resistência a condições ambientais adversas, tais como, geada, temperaturas extremas, seca prolongada, vento forte, e/ou doenças (Lewis e Considine, 1999; Mertz *et al.*, 2009). No caso específico do tamarilho tornar-se-ia vantajoso um aumento da longevidade da planta, uma vez que esta característica constitui uma limitação para a produção de frutos e torna o cultivo desta espécie mais dispendioso pela necessidade de renovação das suas plantações em espaços de tempo relativamente curtos (Meadows, 2002).

A estratégia mais imediata de melhoramento vegetal para a obtenção de variedades mais produtivas é a selecção de plantas pela natureza, como já foi referido, contudo é uma técnica demasiado morosa e limitada. O cruzamento entre variedades é outra solução (Allard, 1999), mas que pode ser dificultada nos casos de baixa variabilidade disponível ou de reduzidas taxas de germinação de sementes. Desta forma, torna-se necessária a utilização de estratégias mais rápidas e com maior eficácia - as estratégias biotecnológicas. Numa abordagem resumida, a cultura *in vitro* permite obter plantas com uma melhor qualidade fitossanitária, a criação de variabilidade genética e o armazenamento de germoplasmas (Brown e Thorpe, 1995). Entre estes procedimentos alternativos pode destacar-se a propagação de meristemas, a hibridização de variantes (Brown e Thorpe, 1995), a indução de embriogénese somática (Correia *et al.*, 2009), a transformação genética (Atkinson e Gardner, 1993; Surekha *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2009; Vidal *et al.*, 2010; Varghese e Bhat, 2011), a criopreservação (Montoya *et al.*, 2000) e a indução de haploidia ou poliploidia (Pintos *et al.*, 2007). De facto muitas das

espécies que hoje são utilizadas na agricultura são espécies poliplóides, como por exemplo *Pyrus pyrifolia* N. cv. Hosui (Kadota e Niimi, 2002), *Vitis vinifera* L. (Yang *et al.*, 2006) e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (Zhang *et al.*, 2007), tendo-se tornado por esta via mais interessantes do ponto de vista agronómico que os diplóides correspondentes.

Recentemente foi realizado no nosso laboratório um estudo (Antunes, 2010) em que um dos principais objectivos era a indução de plantas tetraplóides, com agentes c-mitóticos, no tamarilho. Este objectivo foi alcançado sendo obtida uma taxa de indução de 33,3% para o melhor tratamento, revelando que a colquicina é um agente c-mitótico mais eficaz que a orizalina. A confirmação da duplicação cromossómica nos tetraplóides ($2n=4x=48$) foi posteriormente confirmada com a observação do cariótipo de algumas plântulas.

Assim, pode concluir-se que estudos e avanços no melhoramento de tamarilho, associados a protocolos eficientes de regeneração das plantas *in vitro*, podem desempenhar um papel decisivo no desenvolvimento de novos clones resistentes a *stresses* abióticos, vírus, pestes e doenças que, através dos cruzamentos convencionais, são difíceis de obter. Contudo, num futuro próximo, será importante monitorizar o desenvolvimento das plântulas de tamarilho *ex vitro* e, quantificar as vantagens do processo desenvolvido.

1.3. Objectivos

O tamarilho tem-se revelado uma espécie com grande potencial, para o estudo e optimização de aspectos particulares da morfogénese *in vitro*, particularmente da embriogénese somática.

O facto do sistema de ES no tamarilho permitir a obtenção de tecido embriogénico com grande capacidade de proliferação e a manutenção destas linhas em cultura, por períodos relativamente prolongados de tempo, constitui uma ferramenta com grande potencial biotecnológico não só para a clonagem em massa de plantas de tamarilho, mas também para a obtenção de metabolitos com interesse económico, para a preservação de germoplasma e para o melhoramento da espécie, através da aplicação de protocolos de transformação genética.

Tendo em conta estes pressupostos, o trabalho realizado teve como objectivos principais a optimização de protocolos de indução de ES em vários génotipos de tamarilho com potencial interesse, bem como o desenvolvimento de um protocolo eficiente para a cultura de suspensões celulares de tecido embriogénico de tamarilho para posterior aplicação em ensaios de transformação genética. Para a concretização destes objectivos procedeu-se a diversos ensaios com diferentes condições de indução de ES em plantas diplóides e tetraplóides de tamarilho, e à sua análise morfológica e citológica. Analisou-se o crescimento de culturas de suspensões celulares de tecido embriogénico de tamarilho de forma a optimizar o protocolo, no sentido da aplicação destas culturas em massa, em protocolos de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* e à pesquisa de proteínas secretadas por estas células para o meio de cultura. Os procedimentos e os resultados obtidos estão descritos nas secções seguintes.

2. MATERIAL E MÉTODOS



2.1. Material vegetal

Na realização deste trabalho foi utilizado material vegetal proveniente de uma árvore de tamarilho vermelho (TV), com cerca de 13 anos, existente no Jardim Botânico da Universidade de Coimbra (JBUC), e material vegetal previamente estabelecido em cultura, nomeadamente uma linha de clones de uma planta de tamarilho vermelho de origem seminal (linha T0, diplóide) e linhas de clones obtidas de plantas tetraplóides (linhas T1 e T2) e mixoplóides (linha T3). As plantas T1, T2 e T3 foram obtidas em trabalhos anteriores (Antunes, 2011), por tratamento com colquicina. Utilizaram-se também diferentes tipos de calo embriogénico (CEV e CEG) e não embriogénico (CNEB) obtidos por indução de ES em explantes foliares de plantas da linha T0.

2.2. Métodos

2.2.1. Estabelecimento *in vitro* de material proveniente de planta adulta

a) *Cultura de segmentos nodais*

A cultura de segmentos nodais de tamarilho foi iniciada a partir de ramos com 1 a 2 cm de diâmetro, colhidos da árvore adulta existente no JBUC (Fig. 5A). Os ramos com cerca de 20 cm foram lavados em água corrente, tratados com uma solução fungicida (Benlato a 6% w/v) e colocados num recipiente com água, permitindo o desenvolvimento de rebentos axilares em ambiente controlado, a 20°C, 80-90% de humidade relativa e um fotoperíodo de 16h luz / 8h escuro. Após 2 - 3 semanas, os rebentos axilares desenvolvidos (com cerca de 1,5 cm) foram usados como explante (Fig. 6A). Os segmentos nodais, com 2 cm de comprimento, com um só rebento e desprovidos de folhas, foram lavados em cerca de 100 ml de água com 2 - 3 gotas de Tween 20, e superficialmente esterilizados por breve imersão (30 s) em etanol a 70% (v/v), seguida de uma desinfecção em solução de 7% (w/v) de hipoclorito de cálcio com 2 - 3 gotas de Tween 20, 15 minutos sob agitação. Após desinfecção, os segmentos nodais foram lavados 3 vezes em água esterilizada. Cerca de 40 zonas meristemáticas

axilares, depois de devidamente tratadas e separadas dos tecidos envolventes do segmento nodal, foram inoculadas em tubos de ensaio (15 x 2,2 cm) com cerca de 15 ml de meio MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com 0,2 mg/l de benziladenina (BA) e 3% de sacarose. Foi adicionado ao meio 0,6% de agar e o pH foi ajustado para 5,6 - 5,8 antes da autoclavagem a 121°C durante 20 minutos. O desenvolvimento dos rebentos desta linha proveniente de material adulto de tamarilho vermelho (designada TVA) ocorreu a 25°C com um fotoperíodo de 16h luz / 8h escuro. Para o enraizamento das plântulas, estas foram transferidas para meio base MS com 3% de sacarose.

b) Cultura de segmentos internodais

Ramos jovens (Fig. 5B), com cerca de 20 cm de comprimento e 1 cm de espessura, foram recolhidos da árvore adulta do JBUC e desinfectados de forma semelhante à descrita anteriormente. Depois de devidamente tratados, os segmentos nodais foram também utilizados para a inoculação das zonas meristemáticas como descrito na secção anterior. Os segmentos internodais sofreram tratamento diferente: alguns foram seleccionados para a realização de cortes semi-finos para observação ao microscópio óptico; aos restantes retirou-se, com a ajuda de uma pinça e um bisturi, a camada mais externa, deixando a zona do câmbio vascular. Estes segmentos foram cortados em secções com cerca de 1 mm de espessura, que foram inoculadas em tubos de ensaio (15 x 2,2 cm) com cerca de 15 ml de meio e em frascos de cultura (6,6 x 5,9 cm) com cerca de 20 ml de meio. Foram testados diferentes meios de cultura cuja composição está descrita na tabela 1. Todos os meios foram gelificados com agar 6% (w/v) e o pH ajustado para 5,6 - 5,8, procedendo-se em seguida a uma autoclavagem a 121°C durante 20 minutos. As culturas foram mantidas em estufa, no escuro, a 24±1°C, durante 3 meses e depois transferidas para meio MX (meio base MS suplementado com 9% de sacarose, 1mg/l de 2,4-D e 0,1mg/l de KIN).



Figura 5. Material vegetal usado para o estabelecimento *in vitro* de material proveniente do tamarilho adulto. Rebento axilar (A) para a cultura de segmentos nodais e ramos jovens (B) usados para a cultura de secções internodais.

Tabela 1. Diferentes condições testadas na indução de ES a partir de segmentos internodais da árvore de tamarilho adulto do JBUC.

Explante	Recipientes de cultura	Meio de indução de embriogênese somática (meio base MS com 9% sacarose)	
		Meio	Regulador do crescimento vegetal (mg/l)
Segmentos internodais com 1 mm de espessura (planta adulta TV)	Tubos de ensaio (15x2,2cm) 1 explante/tubo	TD	2,4 - D (2)
		TD5	2,4 - D (5)
		TP2	picloram (2)
		TP	picloram (5)
	Frascos de cultura (6,6x5,9cm) 4 explantes/frasco	NA2	NAA (2)
		NA5	NAA (5)
		NAK	NAA (2) + KIN (1)
		NAB	NAA (2) + BAP (1)

2.2.2. Caracterização da resposta de diferentes genótipos à indução de ES

a) Análise citogenética e morfológica dos diferentes genótipos

Para a caracterização citogenética e confirmação da ploidia das diferentes linhas em estudo (T0, T1, T2 e T3), procedeu-se à contagem dos cromossomas em células de raízes em crescimento activo, com pelo menos 1 cm de comprimento, de plantas multiplicadas em meio base MS sem reguladores do crescimento vegetal. Os vértices vegetativos das raízes, com cerca de 1,5 cm, foram tratados com colquicina durante 2h no escuro a 25°C, seguindo-se a sua fixação em álcool acético 3:1 (v/v) durante 4h, à temperatura ambiente, e aplicação da técnica de Feulgen (Darlington and La Cour, 1976). Resumidamente, as raízes foram hidrolisadas em HCl 1N em banho-maria a 60°C, durante 6 minutos e transferidas para HCl 1N à temperatura ambiente para depois serem coradas com o reagente de Schiff durante 1-3 h, no escuro. Fez-se o *squash* do material em ácido acético a 45% (v/v) e a observação foi feita num microscópio óptico (Nikon Eclipse E400), sendo as imagens captadas com a câmara Nikon Digital Sight DS-U1 e com o software Act-2U. Durante a observação ao microscópio fez-se a contagem do número de cromossomas das células de cada genótipo em estudo.

Para a caracterização morfológica dos genótipos T0, T1, T2 e T3, analisaram-se plantas com 7 semanas de desenvolvimento em meio MS. Foram medidos os seguintes parâmetros: comprimento e diâmetro do caule, comprimento e largura da maior folha, número de raízes adventícias e de raízes secundárias, e comprimento da maior raiz. Foi também quantificado o número de cloroplastos em 15 células estomáticas de cada uma das linhas T0, T1, T2 e T3. Para tal foi removida uma porção da epiderme (cerca de 5x5 mm) da página inferior de 3 folhas de plantas aclimatizadas há 4 semanas, que foi colocada sobre uma gota de nitrato de prata (AgNO₃) a 1% (w/v). As lâminas foram observadas ao microscópio óptico.

b) Indução de ES

A manutenção e multiplicação das plantas em cultura, diplóides e tetraplóides, foi conseguida através proliferação de meristemas axilares. Plantas com cerca de 6 semanas foram divididas em fitómeros, contendo cada um deles pelo menos um meristema axilar. As folhas foram destacadas desses segmentos que foram colocados em tubos de ensaio (15 x 2,2 cm) com meio BA – meio base MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com 0,2 mg/l de BA, 3% sacarose e 0,6% de agar.

Com o objectivo de caracterizar a resposta dos diferentes genótipos (T0, T1, T2 e T3) à indução de ES testaram-se diferentes condições, nomeadamente a adição de diferentes auxinas, 2,4-D e picloram (meio TD e TP, respectivamente, tabela 1).

Para a indução de ES foram utilizados explantes foliares de plantas das linhas T0, T1, T2 e T3 com cerca de 2 meses de crescimento e com folhas com cerca de 1,5 cm de comprimento. De cada planta retirou-se a zona apical (cerca de 2 cm) que foi colocada em tubos de ensaio com meio BA para assegurar a manutenção das linhas em cultura, e as folhas mais jovens foram destacadas e seccionadas em partes semelhantes sem incluir a nervura central. Estas secções foram feridas e colocadas em tubos de ensaio com a página abaxial em contacto com o meio de cultura (Fig. 6). As culturas foram mantidas em estufa no escuro, a $24\pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 3 meses. Cada tratamento incluiu 3 réplicas, com 12 explantes de cada genótipo.

Com o objectivo de verificar a influência do tempo de manutenção dos explantes no meio de cultura na resposta à indução de ES, realizou-se um ensaio com a linha de plantas diplóides (T0) em meio com a auxina 2,4-D (TD). Para isso foram usados 18 explantes em 4 tratamentos diferentes - TD1, TD2, TD3 e TDc. Nos primeiros três tratamentos o meio foi renovado semanalmente, de duas em duas semanas e de três em três semanas, respectivamente. No tratamento TDc os explantes foram mantidos no mesmo meio continuamente. Este procedimento durou cerca de três meses, durante os quais o material foi mantido em estufa, ao escuro, a $24\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Foi também testado o efeito da adição de diferentes fontes de carbono ao meio de indução de ES (Tabela 2). O material vegetal usado, secções de folhas da linha T0, sofreu o procedimento descrito anteriormente e esquematizado na figura 7. Para cada tratamento foi usado um número total de 12 explantes, em 3 réplicas.

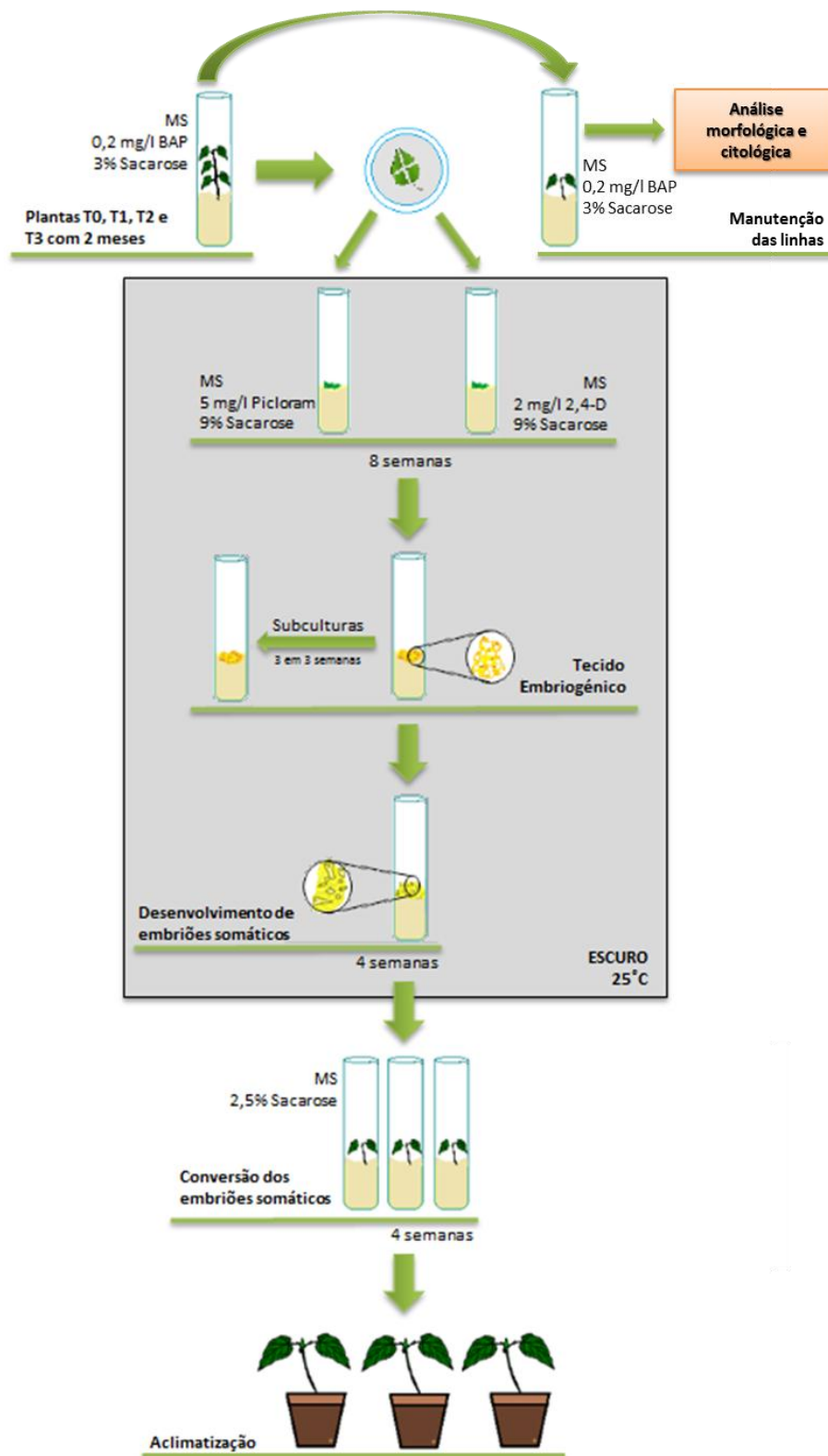


Figura 6. Representação esquemática do protocolo seguido para a caracterização da resposta de diferentes genótipos à indução de embriogênese somática.

Com o meio TD foi ainda testado o efeito da presença de diferentes concentrações de ácido ascórbico no meio de indução de ES (Tabela 2). Neste ensaio foram usados 28 explantes por tratamento, divididos por 4 réplicas. À semelhança dos dois ensaios de indução atrás descritos, o material vegetal utilizado foram secções de folhas de plantas diplóides T0.

Tabela 2. Diferentes fontes de carbono e concentrações de ácido ascórbico testadas nos meios de indução de ES a partir de secções de folhas da linha de plantas T0 (diplóide).

Explante	Meio de indução de embriogénese somática (meio base MS com 2 mg/l de 2,4-D)		
	Meio	Fonte de carbono (%)	Ácido ascórbico (g/l)
Secções de folhas de plantas da linha T0	TD	Sacarose (9)	0
	TD1	Sacarose (4,5) + Manitol (4,5)	0
	TD2	Sacarose (3) + Manitol (6)	0
	TD3	Sacarose (2) + Manitol (7)	0
	TD4	Sacarose (2) + Sorbitol (7)	0
	TD5	Sacarose (2) + Polietileno de glicol 1500 (7)	0
	AS0	Sacarose (9)	0
	AS1	Sacarose (9)	0,25
	AS2	Sacarose (9)	0,5
	AS3	Sacarose (9)	1
	AS4	Sacarose (9)	2
	AS5	Sacarose (9)	4

2.2.3. Estabelecimento de suspensões celulares

a) Determinação da taxa de incremento em massa e optimização da razão massa / volume

Com o objectivo de determinar as taxas de incremento em massa, de suspensões celulares a crescer em diferentes volumes de meio de cultura, transferiram-se massas de calo embriogénico (CEV), compreendidas entre os 10 e os 50 mg, para balões Erlenmeyer de 50 ml, com 10 e 20 ml de meio TP líquido (meio MS suplementado com 5 mg/l de picloram e 9% de sacarose). As suspensões celulares foram colocadas em

cultura numa incubadora com agitação orbital, no escuro, a 25°C e 80 rpm. Para cada tratamento utilizou-se um total de 12 amostras. Após 3 semanas de incubação, as suspensões celulares foram centrifugadas, durante 5 minutos a 300 rpm, para que ocorresse a deposição das massas celulares, foi retirado todo o meio de cultura dos tubos e determinou-se o crescimento do calo embriogénico (incremento 1). Após a pesagem, a massa de calo embriogénico foi transferida para caixas de Petri com meio TP sólido (0.25% Phytigel, Sigma), sendo novamente pesada a cada 3 semanas até se determinar o Incremento 3 (Fig. 7, 1º ensaio).

Num segundo ensaio, massas de CEV com 10, 20, 30, 40 e 50 mg (em 3 réplicas) foram colocadas em balões de 50 ml com 10 e 20 ml de meio TP líquido e tratados de forma igual à descrita no primeiro ensaio até à determinação do Incremento 1. Para obtenção das diferentes massas, a cada 3 semanas, o calo foi transferido para novo meio líquido TP até ser alcançado o incremento 3 (Fig. 7, 2º ensaio). Com este ensaio pretendeu-se determinar a razão mais adequada entre a massa de células embriogénicas e o volume de meio de cultura, de modo a otimizar o crescimento da suspensão celular.

O incremento (em mg) foi calculado pela diferença das massas final (Mf) e inicial (Mi) em cada momento da determinação do incremento, sendo que a massa final foi a última medida para cada tratamento. A percentagem de incremento foi calculada pela fórmula $[(Mf-Mi)/Mi] \times 100$. A análise estatística foi realizada através de uma ANOVA (GraphPad Prism 5) e as diferenças significativas entre os valores analisadas por um Teste de Tukey ($p > 0,05$).

b) Análise proteica de suspensões celulares obtidas de diferentes linhas de calo

Com o objectivo de analisar os perfis proteicos secretados por 3 diferentes linhas de calo - calo embriogénico (CEV), calo embriogénico com reduzida capacidade embriogénica (CEG) e calo não-embriogénico (CNEB), crescidas em suspensão celular, foi realizado um terceiro ensaio, representado na Fig. 8. Neste 3º ensaio, 500 mg dos diferentes tipos de calo em estudo foram inoculadas em 50 ml de meio líquido TP, em balões Erlenmeyer de 100 ml, e crescidas nas mesmas condições descritas para os ensaios 1 e 2. Foram realizadas 3 réplicas para cada tipo de calo. Registou-se apenas a massa obtida após as primeiras 3 semanas, de modo a calcular o incremento 1 (Fig. 7, 3º

ensaio). Aquando da determinação da massa 1 recolheu-se o meio de cultura para extracção e análise do perfil proteico secretado pelas diferentes suspensões celulares.

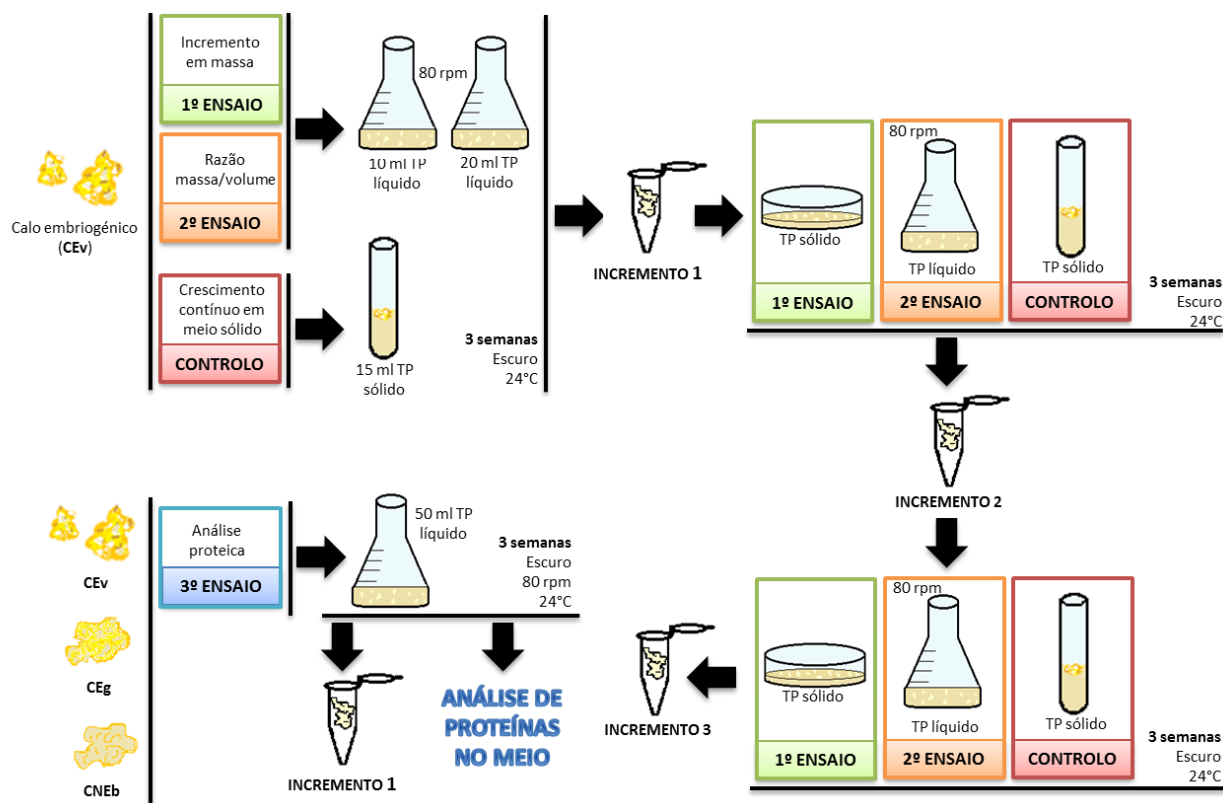


Figura 7. Representação esquemática do protocolo seguido, na utilização de suspensões celulares, para a determinação da taxa de incremento de calo embriogénico e da análise proteica das suspensões provenientes da cultura de diferentes tipos de calo.

Após 3 semanas em cultura, o meio TP líquido das diferentes suspensões celulares, foi recolhido para análise das proteínas secretadas. Após filtração (filtro 0,22 µm) obteve-se um volume total de cerca 40 ml para cada situação (e para as 3 réplicas). Dos 40 ml totais, 15 ml foram concentrados em tubos Millipore com *cut-off* de 10 kDa, em centrifugação a 12 000g durante 15 min, obtendo-se um volume final para análise de 8 ml de solução concentrada. A precipitação das proteínas ocorreu *overnight* a 4°C, com adição de ácido tricloroacético (TCA) 100% numa proporção de 1:1 (v/v) aos 25 ml não concentrados (t) e aos 8 ml de volume concentrado. Às amostras de volume concentrado foi adicionada acetona numa proporção de 1:1, e foram deixadas *overnight* a -20°C.

Após centrifugação (a 12 000g, durante 15 min a 4°C), eliminou-se o sobrenadante, deixou-se secar bem o *pellet* e ressuspendeu-se em 200 µl de solução desnaturante (100mM Tris, 100mM Bicina, 4% SDS (p/v), 8M de ureia, 2% (v/v) de β-mercaptoetanol e 0,08% de azul de bromofenol). As amostras já solubilizadas foram desnaturadas durante 10 min a 80°C e carregadas em gel de acrilamida (12,5%). Foram separados 10 µl e 20µl de amostra, a 110V e o gel foi corado com Comassie blue durante 2h.

A quantificação de proteínas foi feita com o 2-D Quant Kit (GE Healthcare; Amersham Biosciences), seguindo as indicações do guia de utilização e usando BSA como padrão.

2.2.4. Transformação genética de calo embriogénico

a) Estirpes de Agrobacterium tumefaciens e vector

Nos ensaios de transformação genética realizados foi utilizado o vector p35SGUSINT (Vancanneyt *et al.*, 1990) que contém o gene *ntpII* sob regulação do promotor e terminador *nos*, e a região codificante *gusA*, com um intrão, ligada ao promotor do vírus do mosaico da couve-flor 35S (*CaMV35S*), localizado próximo da região do *left border* (Fig. 8). Através de electroporação, incorporou-se o plasmídeo nas estirpes de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (Hoekema *et al.*, 1983), EHA105 (Hood *et al.*, 1993) e C58C1 (Larebeke *et al.*, 1984). Após extracção dos plasmídeos, com o kit de extracção (High Pure Plasmid Isolation Kit - Roche), a transformação das diferentes estirpes foi confirmada por amplificação de fragmentos dos genes *ntpII* e *gusA*. Na reacção de PCR usou-se 15-20 ng de DNA plasmídico extraído de cada estirpe, 0,4 mM de dNTP's, 2,5 mM de MgCl₂, 0,4 µM de cada primer, 1x tampão GoTaq Polimerase e 1 unidade de GoTaq Polimerase (Promega), num volume final de 20 µl. Usou-se os primers 5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3' e 5'-ATCGGGAGCGGCGATAACCGTA-3', para amplificar um fragmento de 700 pb do gene *ntpII* e os primers 5'-CATGAAGATGCTTCG-3' e 5'-ATCCACGCCGTATTCGG-3', para amplificar um fragmento de 636 pb do gene *gusA*. O programa de PCR iniciou com uma primeira desnaturação a 95°C durante 5 min,

seguida por 27 ciclos a 95°C durante 1 minuto, *annealing* a 65°C durante 1 min e 72°C também por 1 min. A fase de alongamento foi levada a cabo a 72°C por 5 min. A reacção decorreu no termociclador MJ Mini Personal Thermal Cyclers (Bio-Rad) e os produtos de PCR foram separados por electroforese em gel de agarose 1% (m/v) corado com 2,5 µl / 100 ml de GelRed (Biotium). Foram carregados 8µl de marcador de DNA (HyperLadder™ II, Bionline) juntamente com os produtos de PCR.

Todas as estipes de *Agrobacterium* foram crescidas em meio Luria broth (LB) com os antibióticos apropriados (50 mg/l canamicina e 100 mg/l rifampicina). Para a co-cultura, foram seleccionadas colónias isoladas de placas com meio selectivo e colocadas a crescer *overnight* em 15 ml de meio líquido LB com os antibióticos, a 28°C, 180 rpm, até a cultura atingir uma densidade óptica de 0,6-0,8 a 600nm.

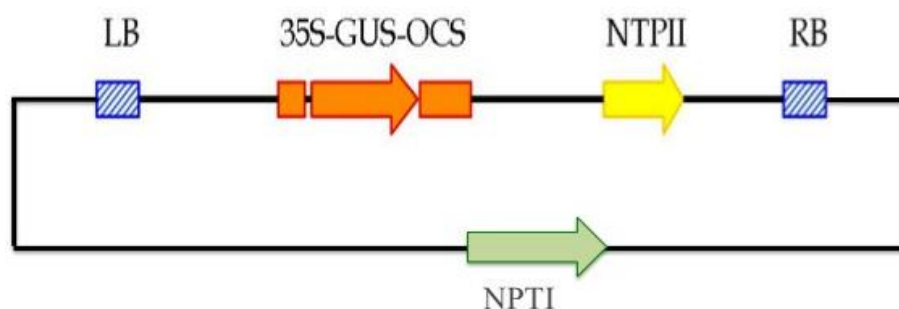


Figura 8. Representação esquemática da construção do plasmídeo p35SGUSINT.

b) Condições de co-cultura e selecção

O calo embriogénico CEV foi usado como explante para os ensaios de transformação (Fig. 9). O meio de transformação consistiu em meio líquido MS suplementado com acetoseringona 20 µM, ao qual foi adicionada a suspensão bacteriana, numa proporção de 1:50. O calo CEV (500 mg) foi removido do meio de indução e manutenção (TP) e incubado no meio de transformação por 60 minutos, a 25°C e a 80 rpm. Após este pré-tratamento, o calo foi seco em papel de filtro esterilizado e colocado em placas com meio TP com 20 µM de acetoseringona. Após 48h de co-cultura no escuro, os explantes foram lavados em meio MS líquido com

carbenecilina (250 µg/ml) e cefotaxima (250 µg/ml) e novamente secos em papel de filtro esterilizado, antes de serem transferidos para placas de Petri com meio TP suplementado com carbenecilina (250 µg/ml), cefotaxima (250 µg/ml) e canamicina (100 µg/ml), solidificado com 0,25% de fitagel (Sigma). As massas de células foram mantidas no escuro a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e transferidas para meio fresco a cada 3 semanas. Depois de 6 semanas, o calo embriogênico foi transferido para meio selectivo de desenvolvimento e conversão de embriões – meio base MS com 100 µg/ml de canamicina, solidificado com 0,25% de Phytigel. Todo o processo de transformação foi acompanhado por controlos que foram tratados como descrito anteriormente (excepto para a presença de antibióticos no meio de cultura). Este procedimento foi repetido por três vezes, sempre com 500 mg de CEV para cada situação.

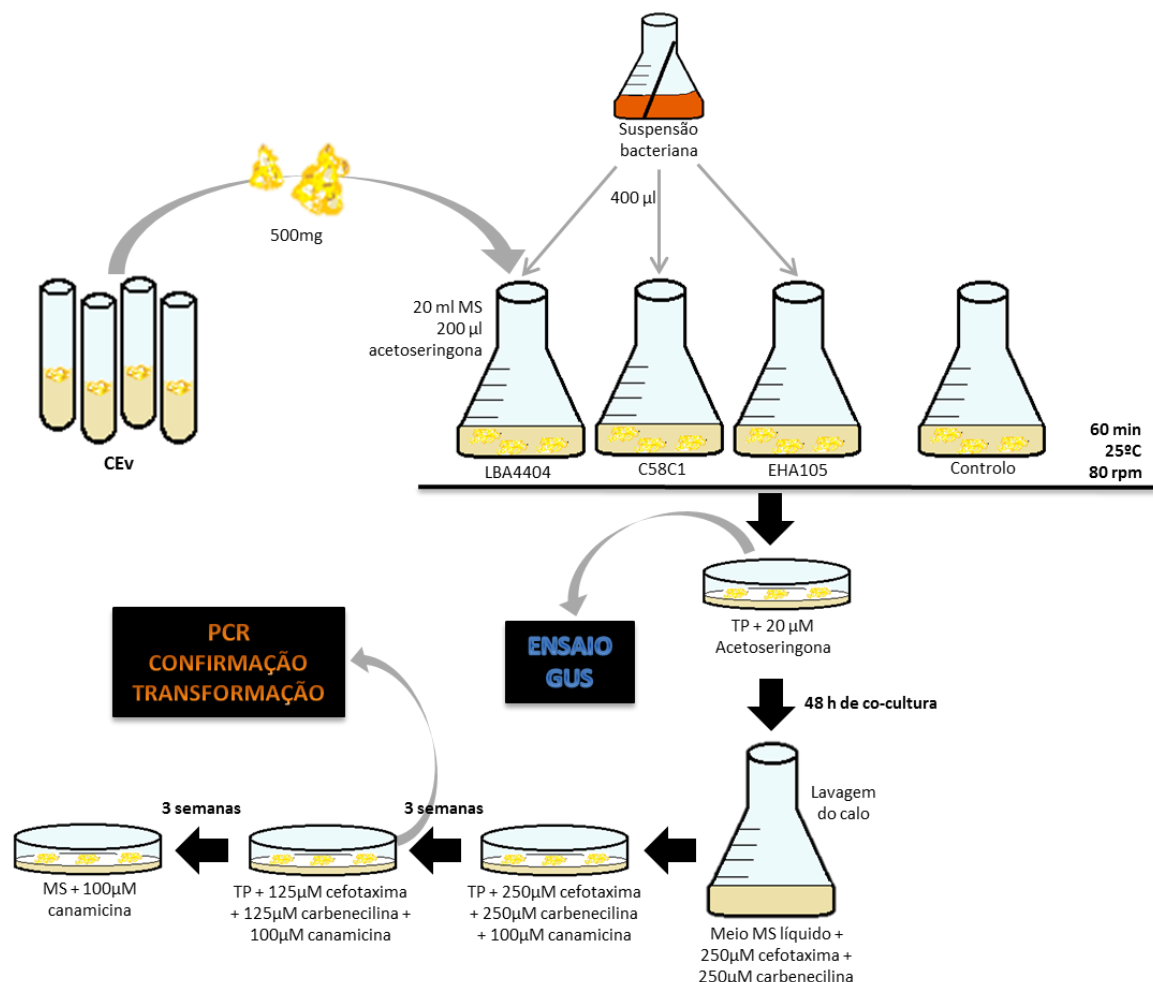


Figura 9. Representação esquemática do procedimento seguido no protocolo de transformação genética de calo embriogênico mediada por 3 estirpes de *Agrobacterium tumefaciens*.

c) Confirmação da transformação por PCR e análise da expressão da β -glucuronidase (GUS)

O processo de transformação foi acompanhado pela observação e quantificação das massas celulares resistentes à canamicina. A transformação dessas massas celulares confirmou-se por PCR e por análise da expressão do gene *gusA*. Para a análise de PCR, extraiu-se DNA de células embriogénicas resistentes à canamicina e de células embriogénicas não transformadas (controlo). As amostras, com cerca de 100 mg, foram maceradas em azoto líquido, usando um almofariz e um pilão, até a sua consistência passar a pó fino. O DNA genómico foi extraído usando o DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen). A concentração e qualidade do DNA genómico foi determinada usando um espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies). A amplificação do DNA foi levada a cabo como descrito anteriormente, num termociclador MJ Mini Personal Thermal Cycler (BioRad) e usando os mesmos *primers* e as mesmas condições de PCR usados na amplificação dos fragmentos dos genes *nptII* e *gusA* dos plasmídeos. Foram ainda utilizados os *primers* 5'-CGTTCCACATGGTGGT-3' e 5'-ATCGGCTCCGTACTAT-3', para amplificação de um fragmento de 765 pb do gene *nptII* com o objectivo de verificar a contaminação do DNA extraído das amostras com DNA de *Agrobacterium tumefaciens*. Os produtos da reacção de PCR foram separados por electroforese num gel de agarose (1% w/v) em tampão TBE 1%, corado com GelRed. Foram carregados 8 μ l de marcador de DNA (HyperLadder™ II, Bioline) juntamente com os produtos de PCR.

Para a realização do ensaio histoquímico GUS usou-se massas de calo CEV transformadas, seguindo-se o procedimento descrito por Jefferson (1987), com algumas modificações. Cerca de 100 mg de CEV resistente à canamicina foram incubados, *overnight* a 37°C, em 1 ml de solução X-Gluc: 25 mg X – GAL (5-bromo-4-cloro-3-indolyl β -D-galactopiranosida), 250 μ l DMF (dimetilformamida), 250 μ l Triton X-100, 100 μ l EDTA 500 mM, 250 μ l $K_3Fe(CN)_6$ 100mM (ferricianeto de potássio), 250 μ l $K_4Fe(CN)_6$ 100mM (ferrocianeto de potássio) e tampão fosfato até perfazer 50ml. Após a reacção, os explantes foram lavados em etanol a 70% até se observar a expressão da β -glucuronidase.

3. RESULTADOS



3.1. Estabelecimento *in vitro* de material proveniente de planta adulta

3.1.1. Cultura de segmentos nodais

Os segmentos nodais obtidos a partir da árvore adulta de tamarilho com cerca de 13 anos (Fig. 1A, secção 1.2.1.) apresentaram elevadas taxas de contaminação, com 87,5% dos explantes (de um total de 40) a exibirem crescimento de fungos. Os explantes não contaminados (12,5%), ao fim de 6 semanas de cultura, desenvolveram pelo menos um rebento, com um comprimento entre 2-3 cm, e cerca de 1-2 nós (Figs. 10A e 10B). Os segmentos nodais destes rebentos foram usados para a sua multiplicação, nas mesmas condições de cultura, aumentando para o dobro o número de plantas por clone obtidas a partir do material adulto estabelecido. Os rebentos foram enraizados em meio MS sem reguladores de crescimento (Fig. 10C).

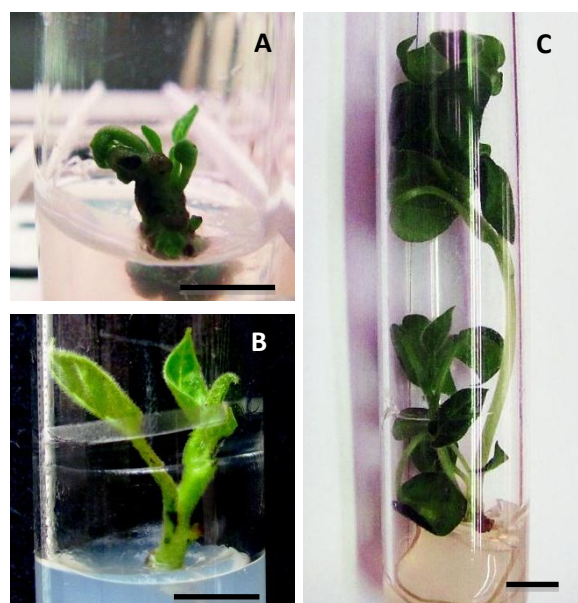


Figura 10. Aspectos da clonagem *in vitro* de uma planta adulta de tamarilho a partir do estabelecimento de segmentos nodais. Diferentes estádios de desenvolvimento dos rebentos resultantes da proliferação de meristemas axilares, após uma semana (A) e quatro semanas (B) em meio MS suplementado com 0,2 mg/l de BAP e após 8 semanas (C) em meio MS sem reguladores do crescimento. As barras correspondem a 1 cm.

3.1.2. Indução de calo a partir de secções internodais

Com o objectivo de estabelecer *in vitro* material proveniente de uma planta adulta, procedeu-se também à inoculação de secções internodais (Fig. 11) em diferentes meios de indução de ES. Apesar das elevadas taxas de infecção observadas, conseguiu-se a indução de tecido caloso nos explantes inoculados em meios de cultura com picloram (Tabela 4). Nos meios de cultura com outras auxinas (TD, TD5, NA2 e NA5), ou com uma auxina em combinação com uma citocinina (NAK e NAB), não houve qualquer tipo de resposta (Tabela 4). Relativamente às taxas de infecção, em todos os tratamentos ocorreu contaminação, mas foi no meio TP2 que se verificou a taxa mais elevada (15%). Realizou-se ainda um outro ensaio, onde os segmentos foram seccionados com cerca de 3 mm de espessura e inoculados nas mesmas condições. No entanto, mostraram uma maior taxa de infecção, sendo que em quase 100% dos explantes houve crescimento de microrganismos.

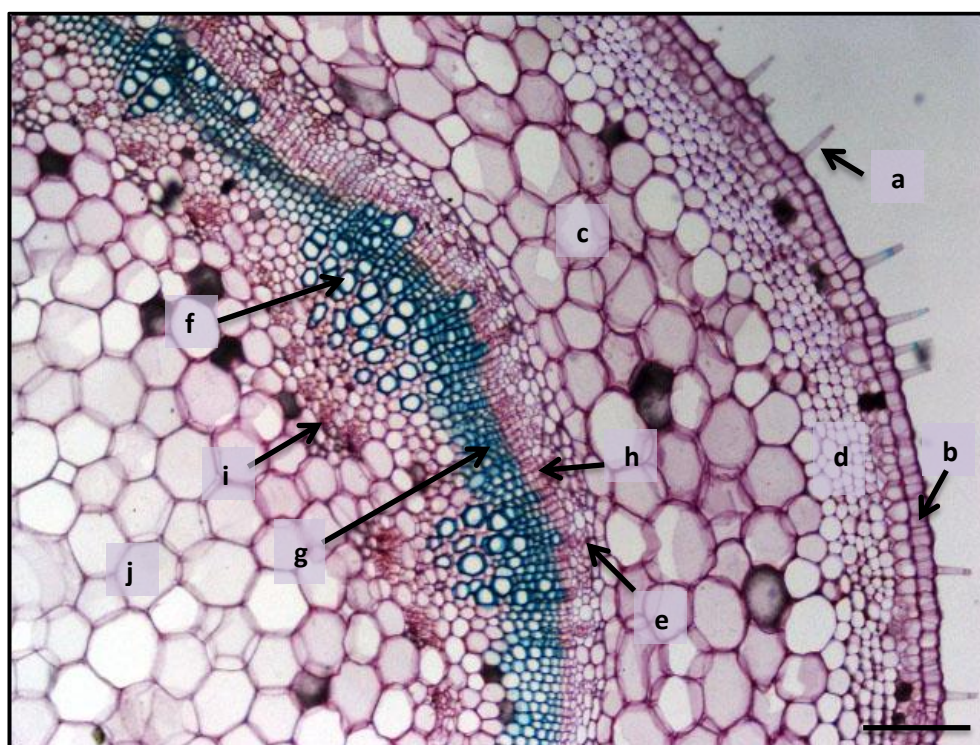


Figura 11. Corte anatómico de um ramo jovem da planta adulta de tamarilho com uma ampliação de 100x. É possível distinguir os tricomas (a), epiderme (b), parênquima (c), colênquima (d), floema primário (e), o xilema primário (f), xilema secundário (g), floema secundário (h), floema interno (i), medula (j). A barra corresponde a 100 µm.

No tratamento das secções inoculadas procurou-se remover o máximo de tecidos em torno da medula, deixando a região do câmbio vascular a envolver a zona medular (Fig. 11). Após 4 semanas de cultura já foi possível notar sinais de desdiferenciação nos explantes (Fig. 12A). A zona periférica da secção foi aquela que melhor reagiu, observando-se, ao fim de 8 semanas, o aparecimento de dois tecidos calosos distintos: um tecido de tonalidade esbranquiçada (Fig. 12B e 12C) e outro com uma tonalidade amarelada e de crescimento mais activo (Fig. 12C) que se desenvolveu em todo o redor da secção. Até às 12 semanas após o início da indução, o tecido caloso esbranquiçado desenvolveu-se apenas em 4% dos explantes inoculados no meio TP2, num total de 49 explantes. De referir que este tecido apresenta muitas semelhanças com os calos embriogénicos obtidos a partir de folhas ou de embriões zigóticos. O tecido caloso amarelado desenvolveu-se em explantes cultivados em ambos os meios de indução com picloram (TP2 e TP), no entanto, no meio TP2, onde a concentração da auxina era menor, 17% dos explantes foram induzidos a formar este tecido, enquanto no meio TP a taxa de indução foi de apenas 2%. Após a transferência dos dois tipos de tecido caloso obtido para meio de cultura com uma auxina (1 mg/l de 2,4-D) e uma citocinina (0,1 mg/l de KIN) verificou-se um aumento da taxa de crescimento dos mesmos tecidos (Fig. 12D e 12E).

Tabela 4. Indução de calo em secções de medula provenientes de uma planta adulta de tamarilho. Os resultados foram registados após 12 semanas de cultura, no escuro, a 25°C. Os valores apresentados consistem nas percentagens observadas para um total de cerca de 20 explantes por tratamento.

Explante	Meio	Hormona (mg/l)	Indução calo (%)	Infecção (%)
Secções internodais com 1mm de espessura	TD	2,4 - D (2)	0	13
	TD5	2,4 - D (5)	0	13
	TP2	picloram (2)	17	15
	TP	picloram (5)	2	8
	NA2	NAA (2)	0	12
	NA5	NAA (5)	0	12
	NAK	NAA (2) + KIN (1)	0	11
	NAB	NAA (2) + BAP (1)	0	8

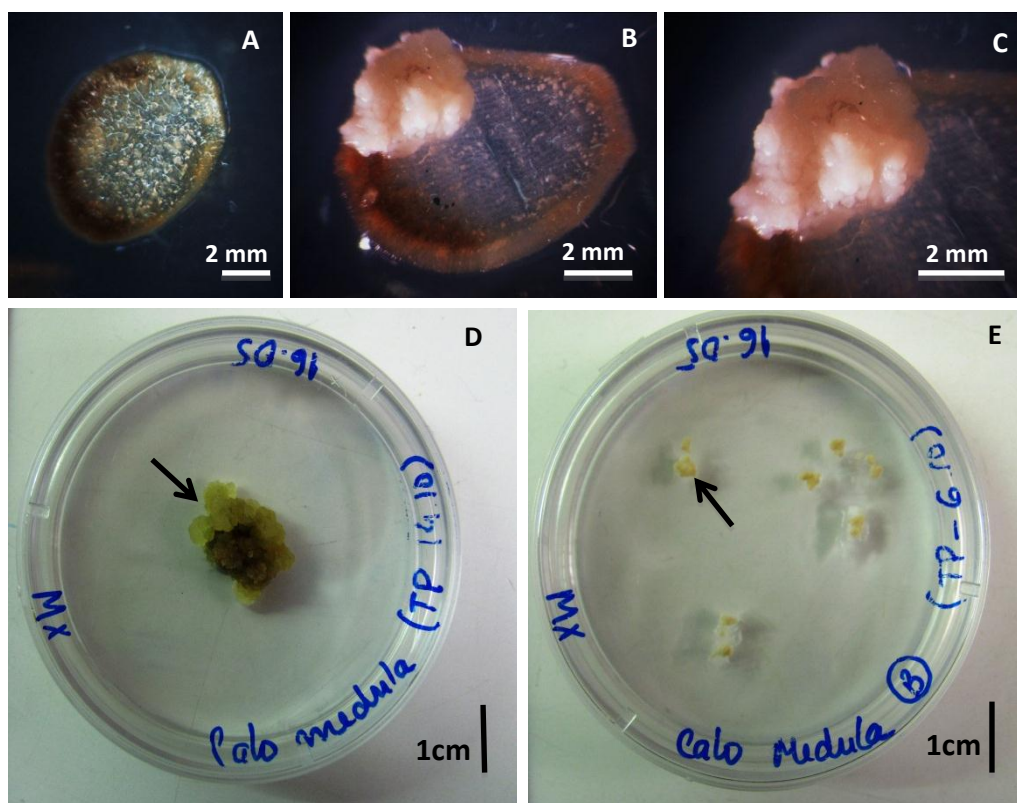


Figura 12. Formação de diferentes tipos de tecido caloso em secções internodais de planta adulta. (A) Secção após 4 semanas de cultura em meio TD2. (B-C) Formação de tecido caloso esbranquiçado após 8 semanas em cultura em meio TP2. Aspecto do tecido caloso amarelado (D) e do tecido caloso esbranquiçado (E) em meio de cultura MX.

3.2. Caracterização da resposta de diferentes genótipos à indução de ES

3.2.1. Caracterização citogenética e morfológica dos genótipos

As plantas do genótipo T0 constituem um clone estabelecido a partir de uma planta de tamarilho com origem seminal e micropropagada, sendo por isso plantas diplóides. No entanto as plantas T1, T2 e T3 são provenientes de um ensaio recente realizado no nosso laboratório, que consistiu na indução de tetraplóides de tamarilho por tratamento com colquicina. Todos os genótipos foram micropropagados em meio base MS, para que se procedesse à sua análise citogenética e morfológica. Para a confirmação citogenética da ploidia dos genótipos em estudo, incluindo o T0, recorreu-se à técnica de Feulgen, descrita na secção 2.2.2. Confirmou-se que as células das raízes

das plantas do genótipo T0 apresentavam 24 cromossomas (Fig. 13A), o que corresponde ao número diplóide esperado. As plantas dos genótipos T1 e T2 confirmaram-se tetraplóides, apresentando 48 cromossomas (Fig. 13B e 13C, respectivamente). As plantas do genótipo T3 apresentaram células quer com 48 cromossomas (Fig. 13D), quer com 24 (Fig. 13E), tratando-se por isso de um genótipo mixoplóide.

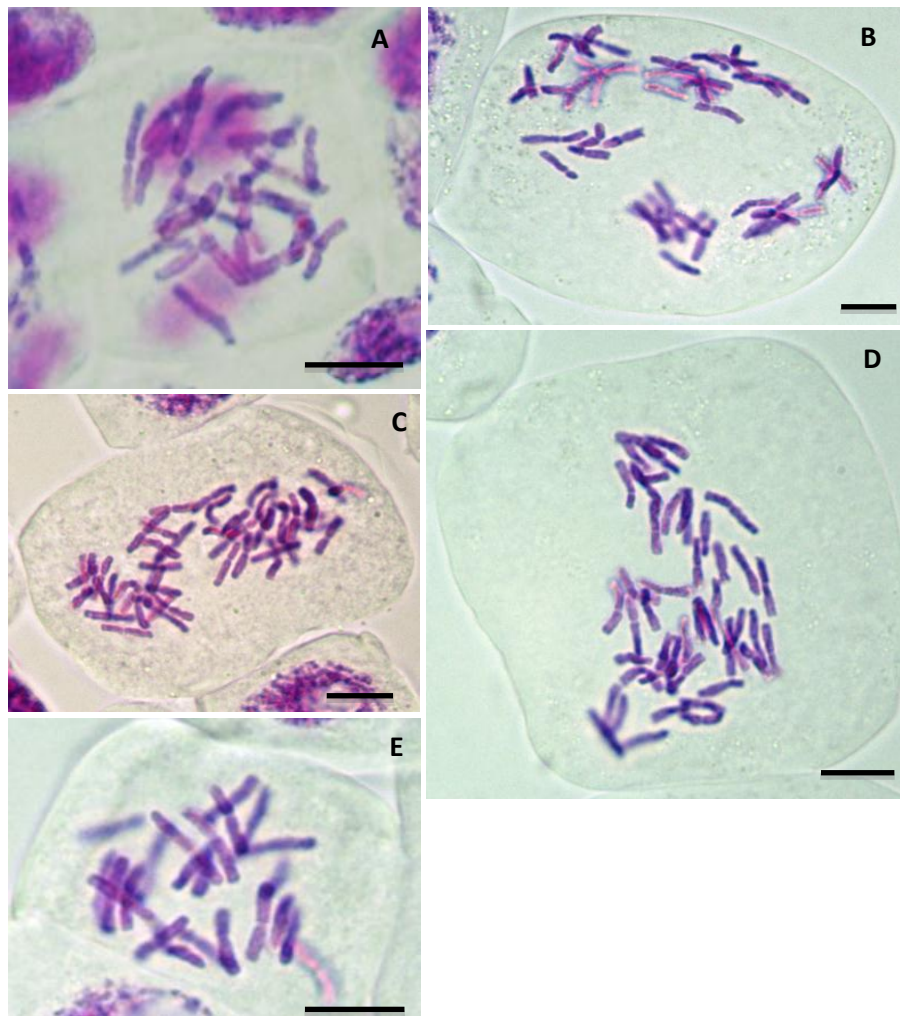


Figura 13. C-metafases em células da raiz dos diferentes genótipos em estudo, com os cromossomas corados pela técnica de Feulgen. (A) Célula com 24 cromossomas do genótipo diplóide T0, (B e C) células com 48 cromossomas dos genótipos tetraplóides T1 e T2, respectivamente, e (D) células com 48 cromossomas e (E) 24 cromossomas da linha mixoplóide T3. As barras correspondem a 10 µm.

RESULTADOS

Com o objectivo de analisar as diferenças entre as linhas em estudo, de acordo com a sua ploidia, observou-se uma característica citológica - o número de cloroplastos presentes nas células guarda dos estomas nas folhas da planta (Fig. 14). Os resultados obtidos (Tabela 5), e a sua análise através da realização de uma ANOVA de uma via, demonstraram a existência de diferenças significativas entre o número de cloroplastos dos estomas das plantas diplóides T0 e o dos restantes genótipos (T1, T2, e T3), não havendo diferenças significativas entre estes últimos.

Tabela 5. Número de cloroplastos nas células guarda dos estomas dos diferentes genótipos de tamarilho. Os valores indicados referem-se ao número de cloroplastos em 5 células guarda observadas em 3 lâminas diferentes. Letras diferentes representam diferenças significativas, segundo o teste Tukey ($p < 0,05$).

Número de cloroplastos				
Réplicas	T0	T1	T2	T3
1	20±3	34±4	34±3	34±4
2	18±2	38±5	36±2	38±5
3	21±2	33±3	40±2	33±3
	20±3 b	35±4 a	37±3 a	35±4 a

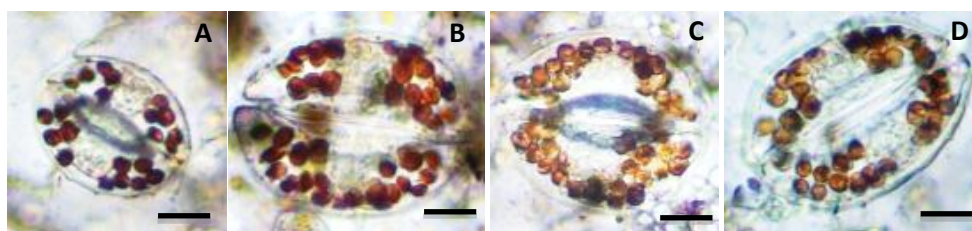


Figura 14. Observação, ao microscópio óptico, de células estomáticas da epiderme das folhas dos diferentes genótipos em estudo, com os cloroplastos marcados com nitrato de prata. (A) Célula estomática diplóide do genótipo T0, (B) Célula estomática tetraplóide do genótipo T1 (C) Célula estomática tetraplóide do genótipo T2 e (D) Célula estomática mixoplóide do genótipo T3. As barras correspondem a 10 μ m.

Após confirmação da ploidia dos genótipos em estudo, analisaram-se as diferentes linhas, tendo em conta diversas características morfológicas avaliadas em plantas com 7 semanas de desenvolvimento. Na tabela 6 estão especificados os parâmetros morfológicos quantificados e indicadas as respectivas diferenças entre os genótipos.

Tabela 6. Parâmetros observados para a caracterização morfológica dos diferentes genótipos T0, T1, T2 e T3. As medições foram feitas em plantas com 7 semanas de cultura em meio MS.

	Nº raízes adventícias (cm)	Nº raízes secundárias (cm)	Comprimento da maior raiz (cm)	Comprimento do caule (cm)	Diâmetro do caule (cm)	Comprimento da maior folha (cm)	Largura da maior folha (cm)
T0	4,0±1,9 a	3,2±3,7 a	9,9±2,7 b,c	4,1±1,3 a,b	0,2±0,1 b	2,0±0,5 a	1,5±0,5 a
T1	3,9±1,4 a	0,9±1,4 a	8,4±2,6 c	3,2±0,9 b	0,3±0,1 a	2,0±0,6 a	1,6±0,5 a
T2	4,4±1,5 a	3,0±2,0 a	11,3±1,7 a,b	5,0±2,5 a	0,3±0,0 a,b	2,3±0,5 a	2,0±0,3 a
T3	5,6±2,7 a	3,8±4,3 a	13±3,1 a	5,5±1,8 a	0,3±0,0 a	2,0±0,4 a	2,6±3,2 a

Os valores das medições são a média (\pm erro padrão) de três réplicas (5 plantas cada). Na mesma coluna, valores com a mesma letra não são significativamente diferentes (teste Tukey, $p < 0,05$).

Os resultados obtidos (Tabela 6) demonstram que há diferenças significativas entre os genótipos em relação a algumas características, nomeadamente no comprimento da maior raiz e no comprimento e diâmetro do caule. No geral observou-se que as plantas mixoplóides (T3) apresentam tendencialmente raízes mais compridas e que as plantas tetraplóides têm caules de maior diâmetro, quando comparadas com as plantas diplóides (T0). Particularmente, o genótipo T1 apresenta caules curtos e de maior diâmetro em relação aos outros genótipos. Nas restantes características não se observou diferenças significativas entre os genótipos.

3.2.2. Indução de ES

A inoculação de secções de folha de tamarilho dos diferentes genótipos em meio de indução de ES conduziu, ao fim de 8 semanas, ao aparecimento de dois *calli* distintos: o calo embriogénico de aparência mais esbranquiçada e organizada e o calo não embriogénico, com uma tonalidade mais amarelada e organização mais friável (Fig. 15). Após 12 semanas o calo embriogénico apresentava já um crescimento considerável. No final deste período foram contabilizados e comparados os resultados obtidos na indução de ES, para as duas auxinas diferentes (picloram e 2,4-D), quanto à taxa de indução de tecido embriogénico (Fig. 16).

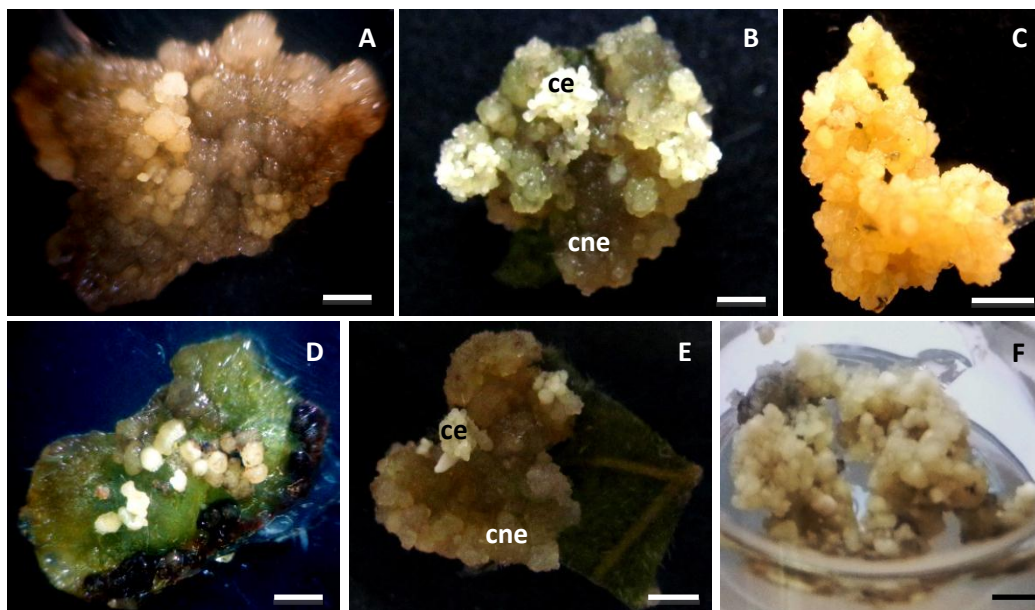


Figura 15. Indução de embriogênese somática em diferentes genótipos de tamarilho, com diferentes auxinas no meio de cultura. (A-C) Indução em meio TP com 5 mg/l de picloram. Explante foliar do genótipo T0 com 4 semanas (A) e 8 semanas (B) de cultura, onde é possível distinguir calo embriogénico (ce) e calo não embriogénico (cne). (C) calo embriogénico resultante da proliferação das massas embriogénicas induzidas e mantido em meio TP. (D-F) Indução em meio TD com 2 mg/l de 2,4-D. Explante foliar do genótipo T0 com 4 semanas (D) e com 8 semanas (E) de cultura e calo embriogénico (F) multiplicado e mantido em meio TD. As barras correspondem a 2 mm.

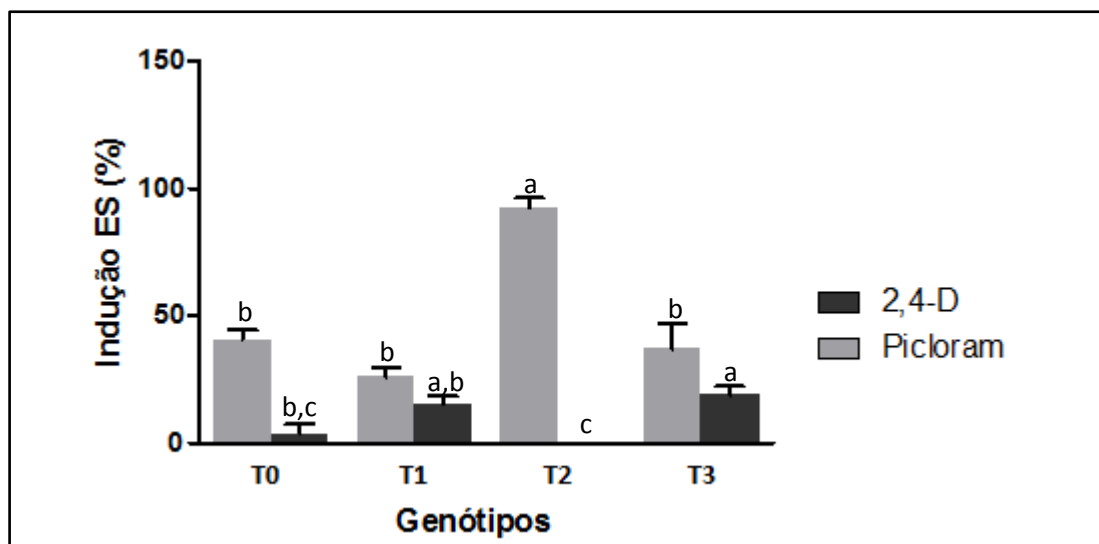


Figura 16. Efeito de diferentes auxinas (2,4-D e picloram) no meio de indução de embriogênese somática. Os valores correspondem à média \pm erro padrão de 3 réplicas com 9 explantes cada. Letras diferentes, para o mesmo tratamento, representam diferenças significativas segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Durante todo o processo de indução de ES foi possível verificar diferenças na desdiferenciação dos explantes induzidos com picloram em relação aos induzidos com 2,4-D. Os explantes induzidos com picloram, passadas apenas 4 semanas de cultura, sofreram uma maior desdiferenciação em toda a sua superfície (Fig. 15A e 15B) enquanto os explantes induzidos com 2,4-D sofreram uma desdiferenciação mais localizada em determinadas regiões (Fig. 15D e 15E).

A maior taxa de indução de ES em todos os genótipos foi obtida com a auxina picloram observando-se, para o genótipo T2, 93% de indução. Com a auxina 2,4-D no mesmo genótipo não houve indução, verificando-se ainda que os outros genótipos apresentaram menores taxas em meios de indução com esta auxina comparativamente aos meios com a auxina picloram.

Verifica-se assim que na indução de ES com picloram, a taxa de indução para o genótipo T2 é significativamente diferente dos restantes e que as diferenças são menos evidentes quando a indução é feita com 2,4-D.

Apesar de o picloram induzir as maiores taxas de formação de calo embriogénico, na manutenção é o calo induzido com 2,4-D que responde melhor, mantendo mais tempo a capacidade de organização em massas embriogénicas, contrariamente ao calo induzido com picloram, que tende a desdiferenciar novamente (dados não apresentados).

Quando os calos embriogénicos foram transferidos para meio MS desprovido de auxinas e com uma concentração de sacarose mais reduzida (4%), no escuro, as massas embriogénicas organizaram-se em embriões somáticos. Após 1 mês de cultura neste meio, os embriões foram transferidos para meio MS com 2% de sacarose e colocados à luz, onde se converteram em plântulas (Fig. 17). Durante estas etapas verificou-se a formação de um grande número de embriões somáticos anómalos que, no entanto, também deram origem a plântulas normais.

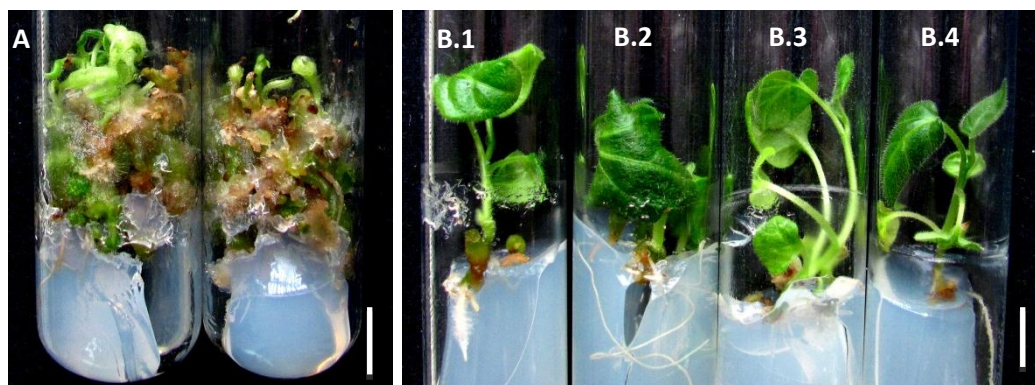


Figura 17. Conversão de embriões somáticos em plantas. **(A)** Desenvolvimento dos embriões somáticos após 6 semanas em cultura. **(B)** Plantas normais dos diferentes genótipos, derivadas de embriões somáticos, **(B.1)** T3, **(B.2)** T1, **(B.3)** T2 e **(B.4)** T0. As barras correspondem a 1 cm.

Com a finalidade de averiguar a resposta dos explantes foliares a diferentes tipos de stresse, foram também testadas várias condições de indução de ES, utilizando-se apenas as plantas diplóides (T0) e meio de indução suplementado com 2,4-D (TD).

Diferentes concentrações de sacarose combinadas com outras fontes de carbono, como o manitol, o sorbitol e o polietilenoglicol (PEG) 1500 foram adicionadas ao meio de indução TD, como consta da tabela 2 da secção 2.2.2. A análise dos resultados (Fig. 18), permite verificar que foi no tratamento S1 (TD suplementado com 4,5% de sacarose e 4,5% de manitol) que houve uma maior taxa de indução de ES (Fig. 18B e 18H). À medida que a concentração de sacarose ia diminuindo verificou-se uma redução na taxa de indução de ES (Fig. 18H). No tratamento S5, no qual foram testados 2% de sacarose e 7% de PEG não houve indução de ES. É de notar que os explantes foliares deste tratamento, às 4 semanas de indução, se encontravam com um aspecto diferente dos restantes, sem qualquer tipo de desdiferenciação do explante em tecido caloso e com uma tonalidade acastanhada, como mostra a figura 18F. A análise estatística revelou que apenas existem diferenças significativas entre os tratamentos S1 e S5 (Fig. 19).

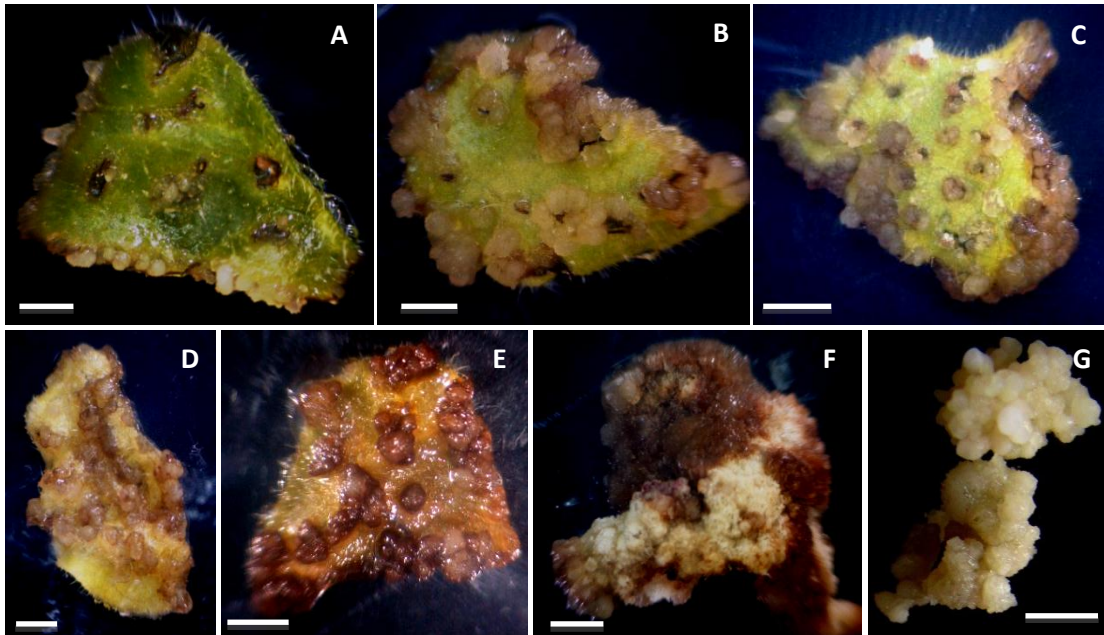


Figura 18. Indução de ES em plantas diplóides (T0) com diferentes concentrações de sacarose, em combinação com outras fontes de carbono, no meio de cultura com 2 mg/l de 2,4-D. (A-F) Explantes após 4 semanas de cultura no tratamento S0 (A), S1(B), S2 (C), S3 (D), S4 (E) e S5 (F). (G) Calo embriogênico resultante do tratamento S1. As barras correspondem a 2 mm.

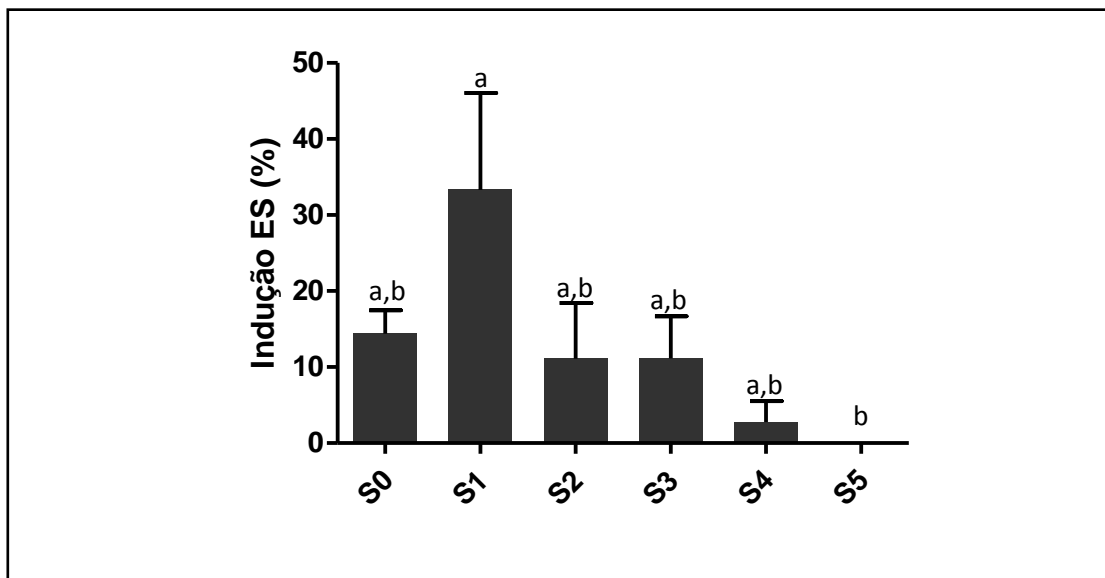


Figura 19. Efeito de diferentes fontes de carbono no meio de indução de ES (meio base MS suplementado com 2mg/l 2,4-D). Letras diferentes representam diferenças significativas segundo o teste Tukey ($p < 0,05$).

Procedeu-se também à análise qualitativa, de outros factores na indução de ES usando o meio TD. Esses factores foram o tempo de manutenção do meio de cultura e a presença de diferentes concentrações de ácido ascórbico no meio (Fig. 20A e 20B). Os resultados obtidos (Fig. 20A), revelam que apenas houve indução de ES nos tratamentos em que o meio foi renovado apenas de 3 em 3 semanas e no tratamento controlo (continuamente em meio de indução). Ao longo dos 3 meses desta experiência, foi possível verificar que os explantes dos tratamentos TDt1 e TDt2, onde o meio era renovado semanalmente e de duas em duas semanas, respectivamente, os explantes após 4 semanas de cultura mantinham-se ainda com uma tonalidade esverdeada e pouco desdiferenciados (Fig. 21A e 21B), enquanto os explantes dos tratamentos TDt3 e TDtc (Fig. 21C e 21D) se encontravam com graus diferentes de desdiferenciação e com uma tonalidade mais acastanhada, resultante de oxidação. Às 8 semanas de cultura já foi possível observar que os explantes dos tratamentos TDt1 e TDt2 (Fig. 21E e 21F) se encontravam totalmente oxidados, já os explantes do TDt3 e TDtc (Fig. 21G e 21H) tinham um aspecto totalmente desdiferenciado começando a notar-se a formação de 2 tipos de tecidos calosos diferentes, um mais amarelado e friável e outro mais esbranquiçado e compacto (Fig. 21H, setas). Após 12 semanas de cultura já foi possível observar a formação de calo embriogénico nos explantes dos tratamentos TDt3 e TDtc (Fig. 21I e 21J). Este calo foi mantido em meio de indução e manutenção TD (Fig. 21K).

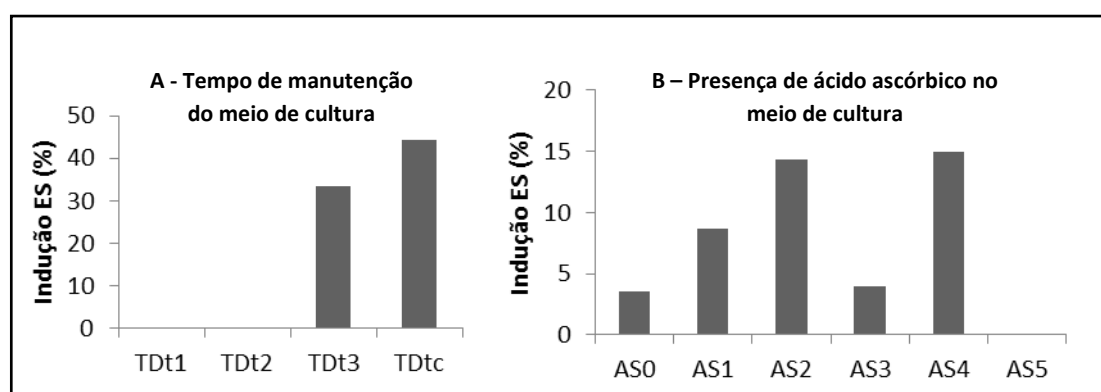


Figura 20. Avaliação do tempo de manutenção dos meios (A) e da presença de ácido ascórbico no meio de cultura (B), na indução de ES em meio TD, para o genótipo diplóide (T0). Os tratamentos TDtc e AS0 funcionam como respectivos controlos.

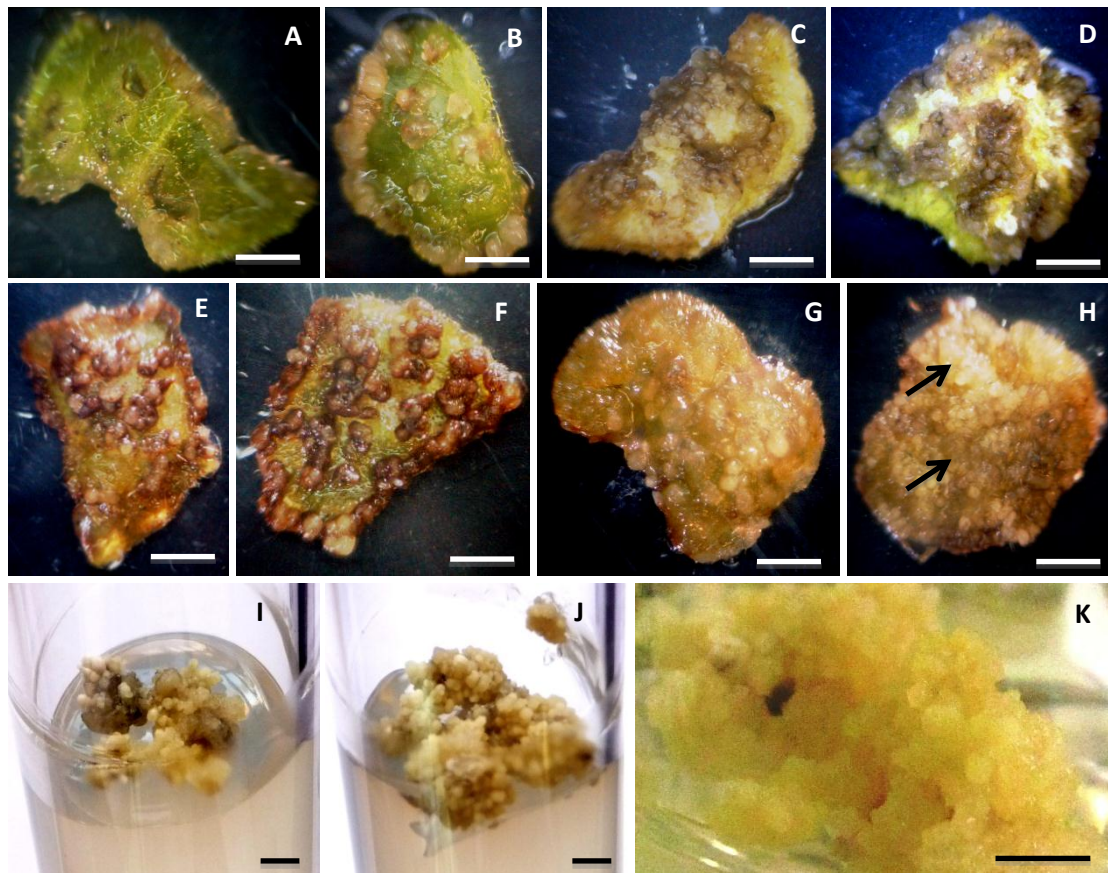


Figura 21. Indução de ES em tamarilho em meio TD após diferentes tempos de manutenção do meio de cultura. (A-D) Explantes com 4 semanas de cultura e (E-F) com 8 semanas de cultura. (A) e (E) explantes do tratamento TDt1, (B) e (F) explantes do tratamento TDt2, (C) e (G) explantes do tratamento TDt3 e (C) e (H) explantes do tratamento controlo TDtc. Tecido embriogénico obtido a partir de explantes do tratamento TDt3 (I) e do tratamento TDtc (J). (K) Aspecto do calo embriogénico em meio TD. As barras correspondem a 2 mm.

A presença de ácido ascórbico no meio (Fig. 20B) revelou que, à excepção do tratamento AS3 e AS5, em todos os outros a percentagem de indução de ES foi superior à do tratamento controlo (AS0).

3.3. Estabelecimento de suspensões celulares

3.3.1. Determinação da taxa de incremento em massa e optimização da razão massa / volume

O primeiro ensaio foi realizado com o objectivo de determinar as taxas de incremento em massa de células de CEV colocadas previamente a crescer em suspensões celulares com diferentes volumes de meio de cultura (10 e 20 ml), antes da sua transferência para meio sólido. Verificou-se um maior incremento das massas de CEV colocadas a crescer em 20 ml relativamente ao incremento das massas colocadas a crescer em 10 ml de meio. No entanto, o maior incremento das massas de CEV foi obtido no tratamento controlo, onde o calo embriogénico foi, continuamente, mantido em meio sólido (Fig. 22).

A análise estatística permite verificar que há diferenças significativas entre os incrementos registados para as diferentes condições de cultura (Fig. 22).

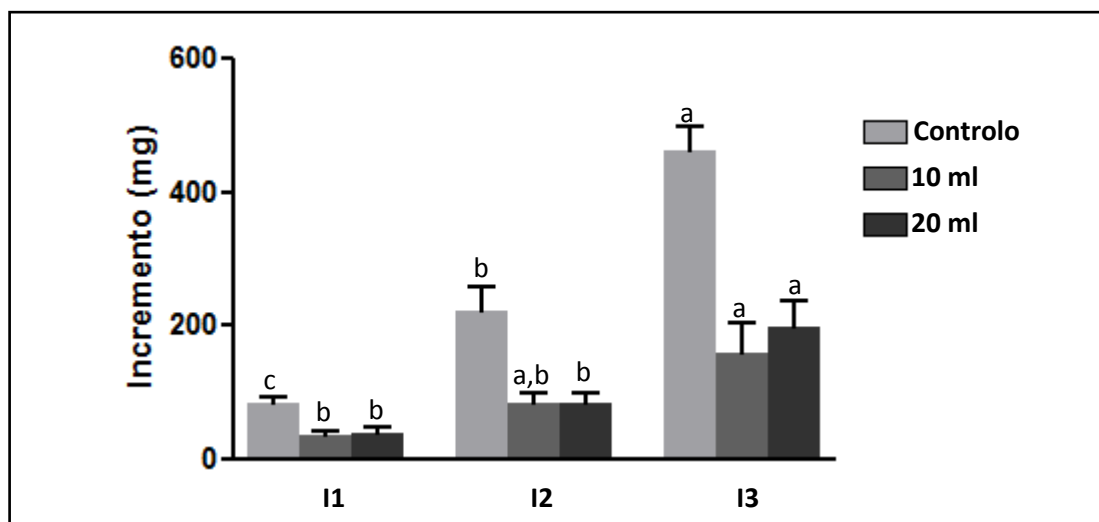


Figura 22. Incremento em massa (\pm erro padrão) de calo embriogénico ao longo do tempo de cultura. Foram medidos os incrementos a cada 3 semanas a partir da massa inicial. O calo embriogénico foi submetido a 2 tratamentos diferentes, num tratamento foi colocado em 10 ml de meio TP líquido até ao incremento 1, noutro foi colocado em 20 ml de meio de cultura TP líquido também até ao incremento 1. No tratamento controlo o calo embriogénico foi sempre mantido em meio de cultura sólido TP. Letras diferentes, no mesmo tratamento, representam diferenças significativas segundo o teste Tukey ($p < 0,05$).

Para as diferentes situações observa-se o aumento significativo do incremento em massa ao longo do tratamento, sendo os valores registados no 3º incremento significativamente superiores aos registados no 1º e 2º incrementos (excepto para a cultura em 10 ml de meio).

No 2º ensaio, em que o objectivo foi a optimização da razão massa/volume, pode verificar-se que num volume de 10 ml de meio líquido, uma massa total de 14 mg teve um incremento de cerca de 700 mg, sendo que o maior crescimento se verificou entre o incremento 2 e o incremento 3 (Fig. 23A). Já uma massa total de 20 mg a crescer em 10 ml de meio líquido teve um incremento de cerca de 400 mg. Nestes dois casos, conseguiu-se determinar os 3 incrementos previstos e as células apresentavam ainda um aspecto viável (Fig. 23C). Quando se colocou mais de 30 mg de massa de CEV no mesmo volume de meio, do incremento 1 para o incremento 2 houve um decréscimo no crescimento, não se conseguindo atingir o ponto de determinação do incremento 3. Nestes casos (para as massas iniciais de 33, 42 e 53 mg), as massas de CEV no ponto de determinação do incremento 2 já se encontravam totalmente oxidadas (Fig. 23D), tendo o meio atingindo a saturação.

Na figura 23B estão representados os crescimentos das massas em 20 ml de meio. A observação dos resultados permitiu constatar que o maior crescimento foi obtido para uma massa inicial de cerca de 42 mg, havendo um incremento total de cerca de 700 mg. Neste tratamento só se verificou uma diminuição do crescimento do incremento 2 para o incremento 3, na situação em que as massas iniciais eram cerca de 52 mg. No ensaio a partir de 42 mg de CEV inicial a maioria das células, no final do tempo de cultura, apresentavam um aspecto viável (Fig. 23E), sendo que as únicas que demonstraram sinais de oxidação foram as que partiram de uma massa inicial de 52 mg (Fig. 23F). Verificou-se portanto que, para volumes de 10 ml de meio, o crescimento só é eficiente para menores massas iniciais de células embriogénicas e que para maiores massas em cultura ocorre a rápida saturação do meio, com declínio do incremento obtido e morte celular. As melhores taxas de crescimento obtidas registaram-se quando se colocou 42 mg de calo embriogénico em crescimento em 20 ml de meio, chegando-se a obter um incremento total de 657 mg (3363 mg de incremento por cada 100 mg de massa inicial).

A análise estatística permite verificar a existência de diferenças significativas entre os incrementos observados para as massas de cerca de 10 mg e 50 mg para os diferentes volumes testados.

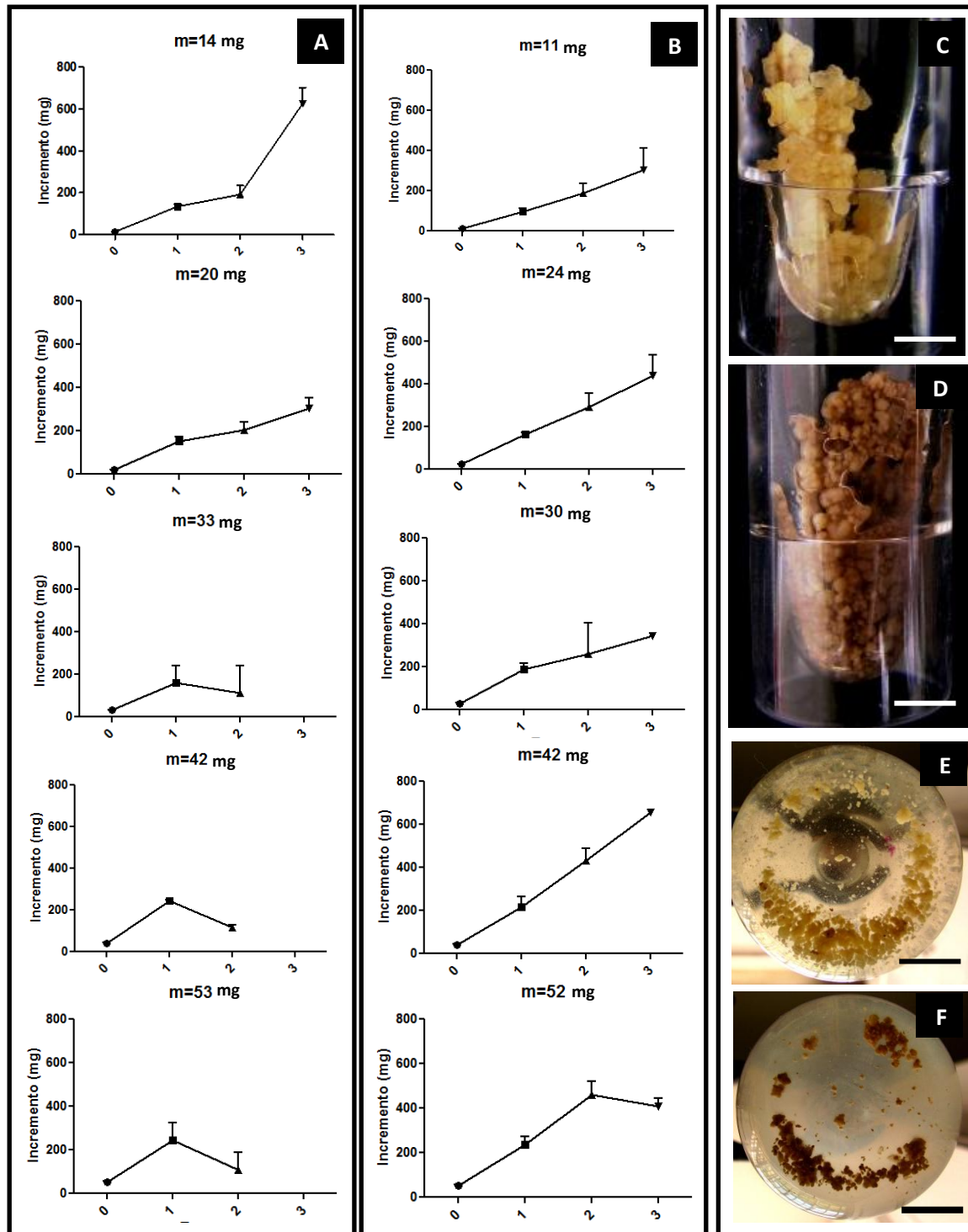


Figura 23. Otimização da razão massa/volume na cultura de calo embriogénico (CEV) em suspensões celulares. Foram testadas massas de CEV de 10 a 50 mg em volumes de 10 ml (A) e 20 ml (B). Células viáveis (C) e oxidadas (D) resultantes do tratamento em 10 ml de volume de meio. Suspensões com células viáveis (E) e oxidadas (F) do tratamento com 20 ml de volume de meio. As barras correspondem a 1 cm.

3.3.2. Análise proteica de suspensões celulares obtidas de diferentes linhas de calo

No 3º ensaio, cujo objectivo foi analisar os perfis proteicos secretados por 3 diferentes linhas de calo - calo embriogénico (CEV), calo embriogénico com reduzida capacidade embriogénica (CEG) e calo não-embriogénico (CNEB), crescidas em suspensão celular, foi possível observar diferenças no crescimento de cada linha de calo em suspensão (Fig. 24A). Na linha CEV, cujas massas se encontravam bem organizadas em agregados celulares, estes cresciam junto ao fundo do balão, ficando o meio translúcido. Já para o CNEB, as massas de células friáveis acabaram por se desagregar durante o crescimento, conferindo turbidez ao meio. As massas de CEG assemelham-se morfológicamente às do CEV. No entanto, o meio não se encontrava tão translúcido como o primeiro, o que parece indicar que existiam massas de células mais friáveis, como as referidas no CNEB, que se desagregavam durante o crescimento. Foi determinado o incremento em massa ao fim de 3 semanas em cultura das 3 linhas de calo e, pôde verificar-se que o incremento do calo não embriogénico (CNEB) é maior e significativamente diferente do incremento dos calos CEV e CEG (Fig. 24B).

Após a extracção das proteínas do meio de cultura das diferentes suspensões celulares (descrita na secção 2.2.3. ii) procedeu-se à quantificação da concentração obtida para cada um dos extractos (Tabela 7), verificando-se que a quantidade de proteínas secretada para o meio de cultura pelos calos embriogénicos é inferior à secretada pelo calo não embriogénico.

Analisando o perfil SDS-PAGE (Fig. 24C) das proteínas secretadas para o meio das diferentes linhas de calo em suspensão, pode verificar-se que só as amostras CEVt e CEGt, resultantes da extracção de proteínas a partir dos extractos totais (não concentrados) das suspensões de CEV e CEG, não apresentam bandas. À excepção destas duas amostras, para todas as outras conseguiu-se detectar proteínas secretadas, nos 10 µl de amostra carregados no gel. Foi para os extractos obtidos a partir das secreções do CNEB que se detectou a maior quantidade (Tabela 7) e diversidade de proteínas (Fig. 22C). Verifica-se a expressão de algumas proteínas (de ≈ 10 kDa) apenas presentes na amostra CNEBt, enquanto outras (de ≈ 25 kDa) se encontram presentes nas amostras CEV e CEG e não em CNEB, nem em CNEBt. Apenas nas amostras CNEB e CNEBt se detecta a presença de uma banda com ≈ 50 kDa, por oposição às bandas de ≈ 20 kDa e de ≈ 75 kDa que são comuns a todas as amostras.

RESULTADOS

Tabela 7. Concentração de proteínas nas amostras analisadas.

	Amostras			
	CEV	CEG	CNEB	CNEBt
Concentração (µg/µl)	0,58	0,65	1,64	1,09
Quantidade de proteína carregada em gel (µg)	5,8	6,5	16,4	10,9

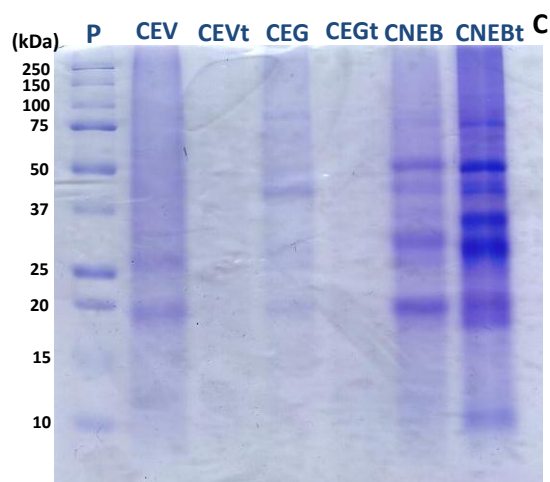
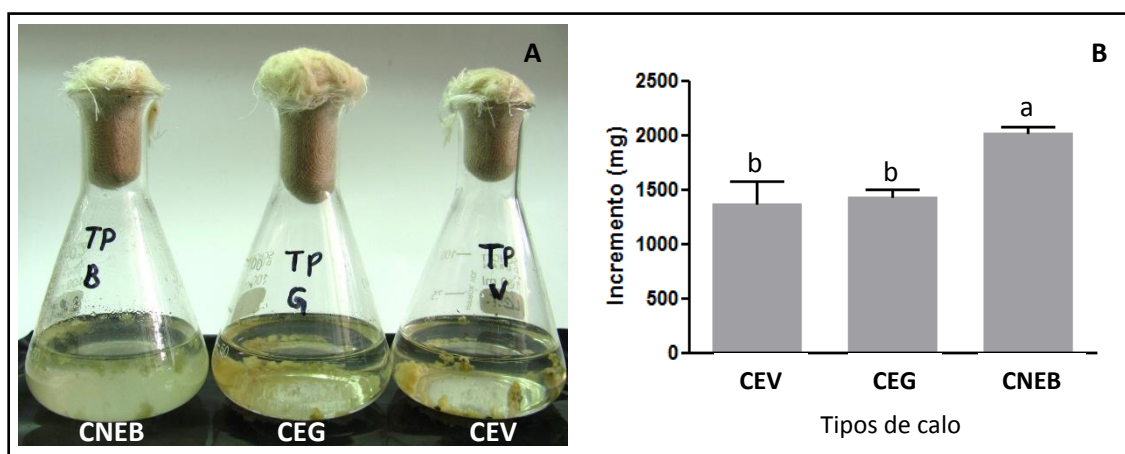


Figura 24. Crescimento e análise proteica de suspensões celulares obtidas a partir de diferentes tipos de calo embriogénico - CEV e CEG e calo não embriogénico - CNEB. (A) Suspensões celulares após 3 semanas de cultura em meio TP líquido. (B) Incremento medido ao fim de 3 semanas, a partir de uma massa inicial de 50 mg em 50 ml de meio de cultura líquido TP (em 3 réplicas). Letras diferentes representam diferenças significativas segundo o teste Tukey ($p < 0,05$). (C) SDS-PAGE do perfil de proteínas secretadas para o meio de cultura das suspensões celulares dos diferentes tipos de tecidos embriogénicos e não embriogénicos. O gel foi carregado com 10 µl de cada amostra por poço.

3.4. Transformação genética de calo embriogénico

3.4.1. Confirmação da electroporação

Para os ensaios de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* foram usadas as estirpes LBA4404, C58C1 e EHA105, possuindo o plasmídeo p35SGUSINT. A confirmação da electroporação do plasmídeo nas estirpes de *Agrobacterium tumefaciens* foi confirmada pela amplificação de fragmentos dos genes *nptII*, com 700 pb (Fig. 25A) e *gusA*, com 636 pb (Fig. 25B).

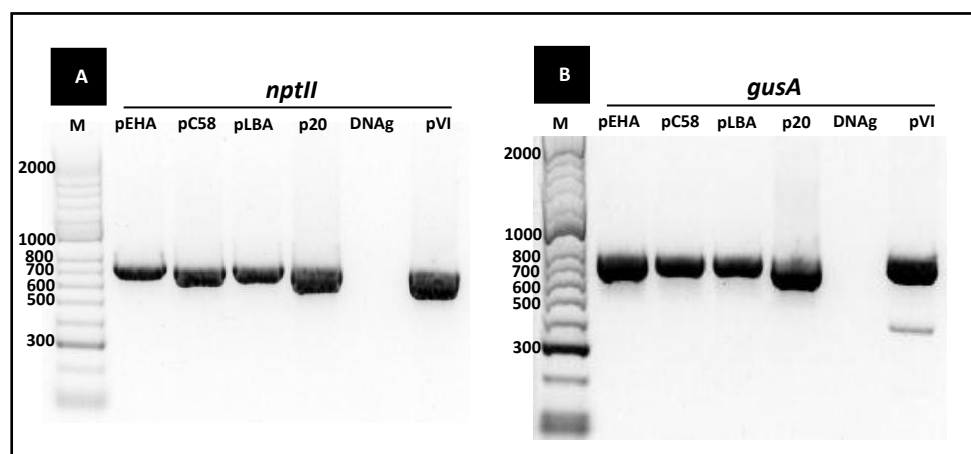


Figura 25. Confirmação da electroporação do plasmídeo p35SGUSINT nas 3 estirpes de *Agrobacterium tumefaciens* pela amplificação de fragmentos dos genes *nptII* (A) e *gusA* (B). Foram utilizados os plasmídeos p20 e pVI como controlos positivos e 100 ng de DNA genómico de tamarilho como controlo negativo. M – marcador de DNA 0,05-2kb HyperLadder™ II (Bioline).

3.4.2. Transformação das linhas celulares de calo embriogénico

O procedimento seguido para o estabelecimento de linhas de calo embriogénico de tamarilho transformadas (descrito na secção 2.2.4.), incluiu um período de co-cultura de 2 dias, seguido de períodos sucessivos de 3 semanas em meios selectivos. Durante a selecção das células transformadas (Fig. 26), as massas de CEV foram mantidas em meio com antibiótico de selecção (canamicina) e antibióticos para eliminação da *Agrobacterium* (carbenicilina e cefotaxima). Todo o processo de transformação e

RESULTADOS

selecção foi acompanhado por controlos positivos e negativos, para certificar a competência embriogénica das células de CEV e a capacidade de selecção dos antibióticos. Ao longo do processo de selecção as massas de calo embriogénico não transformadas, sem resistência à canamicina, vão adquirindo uma tonalidade acastanhada, acabando por morrer, enquanto as células transformadas resistem e proliferam nas mesmas condições selectivas (Fig. 26). A eficácia das 3 estirpes de *Agrobacterium* em estudo foi verificada pela quantificação da percentagem de massas de calo resistentes obtidas ao fim de 6 semanas em meio selectivo (Tabela 8).

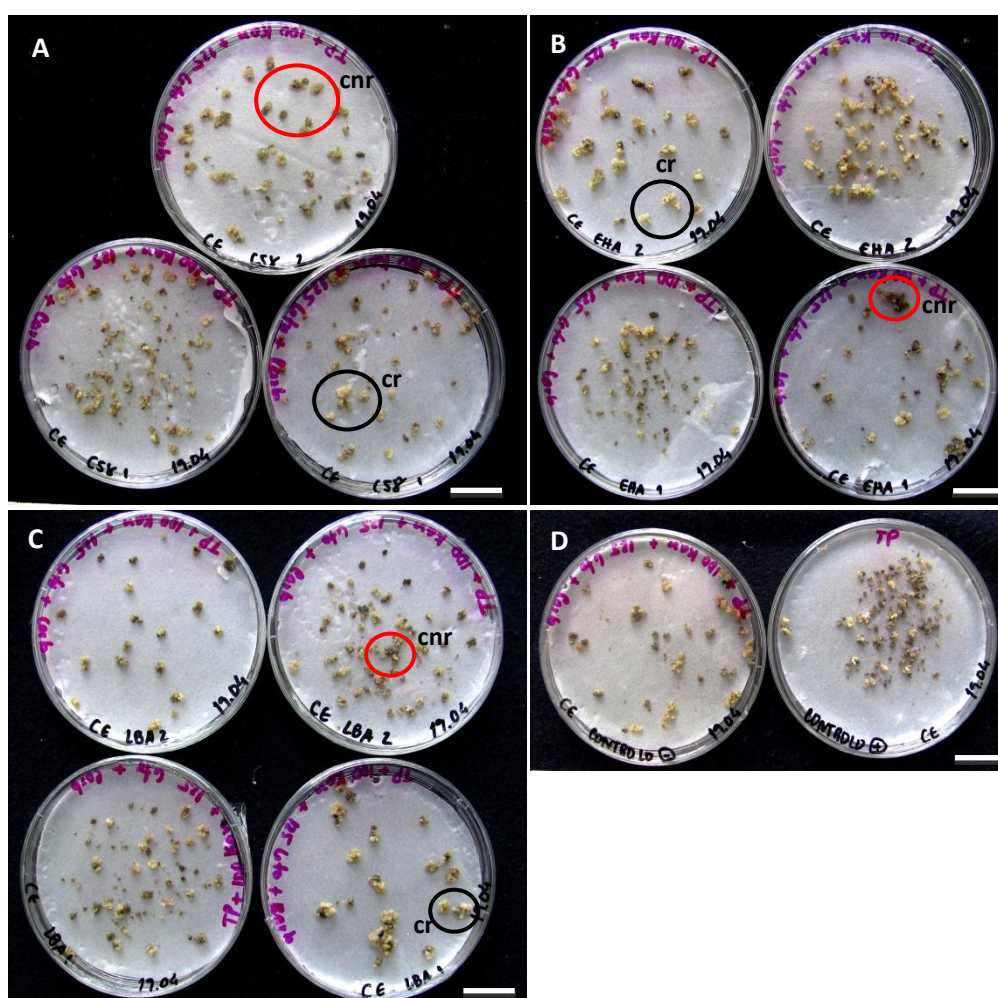


Figura 26. Calo embriogénico em meio selectivo (TP suplementado com 100 mg/l de canamicina, 125 mg/l de cefotaxima e 125 mg/l de carbenicilina). Células transformadas com as estirpes de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (A), EHA105 (B), LBA4404 (C) e controlos (negativo e positivo) (D). Encontram-se indicadas as células resistentes à canamicina (cr) e as não resistentes ao antibiótico (cnr). As barras correspondem a 2 cm.

Tabela 8. Quantificação das massas de CEV transformadas com recurso às diferentes estirpes de *Agrobacterium tumefaciens*. O valor apresentado é a média das percentagens das massas resistentes à canamicina \pm o desvio padrão, registado após 6 semanas em meio TP selectivo.

	Estirpes		
	C58C1	EHA105	LBA4404
Células resistentes à canamicina (%)	41 \pm 10,6	30 \pm 14,7	39 \pm 1,1

3.4.3. *Confirmação da transformação por PCR e análise da expressão da β -glucuronidase*

A confirmação da transformação das células de CEV resistentes à canamicina foi feita através de PCR e por análise da expressão do gene *gusA* em massas celulares analisadas após 6 semanas em meio selectivo. Os resultados de PCR (Fig. 27A) foram positivos para os genes *nptII* e *gusA* nas células transformadas por todas as estirpes. O controlo com a reacção de PCR para o gene *nptI*, permitiu verificar a existência de material genético de *Agrobacterium* nas células transformadas por todas as estirpes, uma vez que o resultado para este gene foi também positivo.

Relativamente ao ensaio GUS, para todas as estirpes de *Agrobacterium tumefaciens* foi possível observar células a manifestar a expressão de β -glucuronidase (Fig. 27B), contudo a estirpe C58C1 manifestou-se mais eficiente observando-se massas maiores com tonalidade azulada, sendo esta ainda mais intensa.

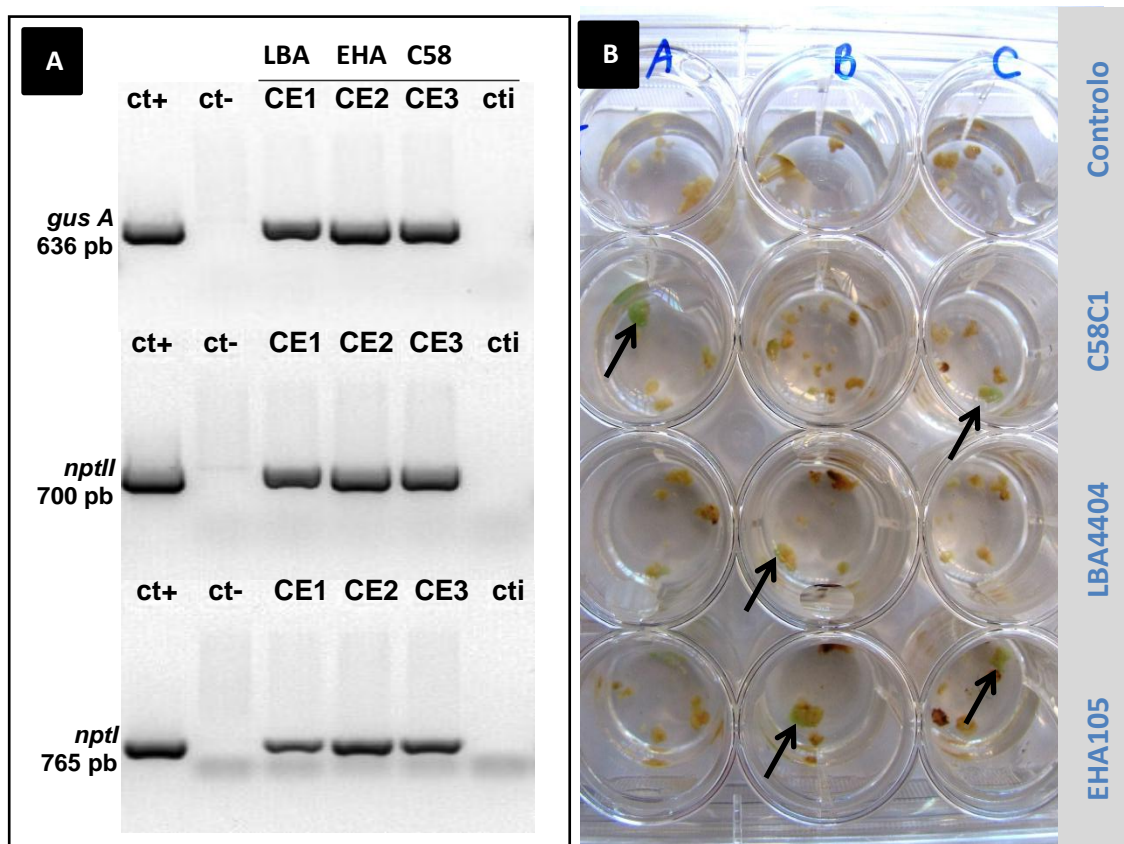


Figura 17. Confirmação da transformação, mediada por 3 estirpes de *Agrobacterium tumefaciens*, de células de calo embriogénico (CE1, CE2 e CE3) com o plasmídeo p35SGUSINT, **(A)** Amplificação de fragmentos dos genes *gusA*, *nptII* e *nptI*. Foi utilizado o plasmídeo P35SGUSINT (usado para a electroporação) como controlo positivo e 100 ng de massas de células de calo embriogénico não transformado como controlo negativo. Cti – Controlo interno. **(B)** Coloração do GUS do calo embriogénico transformado. As setas indicam massas de células embriogénicas a expressar a β -glucuronidase.

4. DISCUSSÃO



4.1. Estabelecimento *in vitro* de material proveniente de planta adulta

Na cultura de plantas *in vitro*, a fase de iniciação e estabelecimento das culturas tem como objectivo a obtenção de explantes não contaminados e em condições de iniciarem a fase seguinte, a fase de multiplicação. Assim, quanto mais eficaz for a iniciação, maior é o número de explantes disponíveis e, conseqüentemente, maior o sucesso da micropropagação. No entanto, o estabelecimento bem sucedido de lenhosas *in vitro* encontra vários entraves, tais como a exsudação de taninos e polifenóis oxidados, o elevado número de contaminações endógenas, ou a recalcitrância de determinados explantes e genótipos (Bonga, 2010).

Na propagação de lenhosas podem utilizar-se meristemas, ápices, zonas apicais ou nós, no entanto, neste trabalho apenas foram utilizados segmentos nodais e a taxa de sucesso foi de 12,5%, sendo que os restantes 87,5% são relativos a contaminações.

A contaminação dos explantes por microrganismos, como fungos e bactérias, é outro dos principais problemas desta fase, pois alguns destes microrganismos crescem muito lentamente e são endógenos, pelo que a desinfecção superficial não os afecta, podendo estes manifestarem-se repetidamente em fases mais adiantadas do processo de micropropagação. Uma optimização no processo de desinfecção deve ser aplicada para a diminuição da taxa de contaminações.

A fraca capacidade do meristema ou da região meristemática, após a sua separação dos tecidos foliares e do caule subjacente, é também uma explicação para as baixas taxas de sucesso referenciadas, uma vez que estes tecidos fornecem hormonas e outros factores de crescimento que o meristema necessita. Devido ao reduzido tamanho deste explante podem infringir-se danos ao meristema que condicionem o seu crescimento (Cassels e Doyle, 2006; Bonga, 2010), o que também pode justificar a reduzida taxa de sucesso neste ensaio.

Foi ainda estabelecido *in vitro* um outro tipo de tecido proveniente de material adulto: secções internodais. Com o estabelecimento deste material *in vitro* procurou induzir-se embriogénese somática, de forma a obter plantas para micropropagação a partir de material de uma árvore adulta de tamarilho. Estudos anteriores com esta espécie revelam que tecido embriogénico e embriões somáticos podem ser obtidos a

partir de tecido embrionário (embriões zigóticos maduros) e pós-embrionário, como por exemplo, folhas jovens de plântulas (Canhoto *et al.*, 2005; Lopes *et al.*, 2000). Os embriões somáticos formam-se, num processo em duas etapas, a partir de massas proembriogénicas que foram induzidas e proliferaram na presença de uma auxina (2,4-D ou picloram). Estas massas proembriogénicas, quando transferidas para um meio desprovido de auxina, começam a formar embriões somáticos (Lopes *et al.*, 2000). Têm vindo a realizar-se tentativas para induzir o mesmo tipo de resposta, com protocolos similares, em diferentes tipos de explantes directamente provenientes de uma árvore adulta, todavia estas tentativas têm falhado. Em todos os explantes testados, apenas foi obtido um tecido caloso friável, de crescimento rápido, em contraste com o tecido embriogénico, de crescimento lento, obtido a partir de embriões zigóticos e folhas jovens (Canhoto *et al.*, 2005; Correia *et al.*, 2011). Estes resultados vão de encontro aos obtidos neste trabalho.

Na tentativa de indução de ES a partir de secções internodais foram testadas diferentes auxinas, isoladas ou em combinação com uma citocinina, mas apenas com a auxina picloram se verificou indução de calo. A maior taxa de indução de calo foi de 17% para a concentração de 2 mg/l de picloram no meio de cultura. Contudo, a maior parte do calo obtido é não embriogénico, de crescimento rápido, com uma tonalidade amarelada e aspecto friável, tal como descrito em resultados de trabalhos anteriores (Correia *et al.*, 2011). Observou-se ainda o desenvolvimento de um tecido caloso de tonalidade esbranquiçada e aspecto mucilaginoso, de crescimento muito lento e de aspecto muito diferente do anterior, mas que se assemelha ao tecido embriogénico formado a partir de folhas ou de embriões zigóticos.

Neste ensaio a maior taxa de infecção dos explantes foi de 15%. Geralmente, quanto maior for o explante, maiores são as taxas de sucesso do estabelecimento *in vitro* de material adulto (Canhoto, 2010), no entanto, explantes de maiores dimensões são também mais susceptíveis a contaminações com microrganismos (Cassels e Doyle, 2006), como foi possível observar no ensaio em que os explantes inoculados tinham uma maior espessura ($\approx 3\text{mm}$), em que houve perto de 100% de infecções.

Ainda que não se tenha conseguido induzir a formação de massas proembriogénicas, é importante salientar que a obtenção de tecido caloso em crescimento activo, poderá ser um importante recurso a explorar para o desenvolvimento de rebentos ou embriões somáticos, desde que submetido aos estímulos adequados. O grande potencial da ES no melhoramento dos cultivares,

permitindo um processo de clonagem eficiente, a multiplicação rápida em larga escala e a transformação genética de linhas seleccionadas, torna crucial o desenvolvimento de protocolos que permitam a indução a partir de explantes provenientes de plantas cujo genótipo é conhecido. No entanto, uma das maiores desvantagens associada ao uso da técnica de ES em árvores tem sido a dificuldade do uso de explantes provenientes directamente de árvores adultas (von Arnold, 2008; Bonga, 2010). A capacidade de propagação vegetativa das árvores diminui com o aumento da idade das mesmas e, árvores adultas têm uma reduzida aptidão para serem clonadas por ES. Todavia, apesar deste impedimento, a indução de ES tem vindo a ser realizada a partir de tecidos de diferentes árvores, como o abacate (Sánchez-Romero *et al.*, 2006), o café (Etienne, 2005), o sobreiro (Toribio *et al.*, 2005), a líchia (Rajarjo e Litz, 2007) e, mesmo coníferas, como a píceia (Klimaszewska *et al.*, 2011).

A razão pela qual as células de tecidos adultos são menos propícias para a desdiferenciação em células rejuvenescidas continua por determinar. De acordo com alguns autores (Litz e Gray, 1995; von Arnold, 2008), as diferenças entre tecidos de plantas jovens e plantas adultas em relação ao seu potencial de regeneração podem ser epigenéticas, resultando na inibição do potencial regenerativo de mais células diferenciadas. Recentemente, Bonga *et al.* (2010) discutiu algumas opções que podem ser exploradas para ultrapassar as dificuldades encontradas na regeneração de plantas lenhosas a partir de tecidos de árvores adultas.

4.2. Caracterização da resposta de diferentes genótipos à indução de ES

O genótipo é também um factor importante a ter em conta na resposta das lenhosas à indução de ES e nas taxas de sucesso obtidas na clonagem de árvores seleccionadas. Por esta razão, neste trabalho procedeu-se primeiramente à caracterização citológica e morfológica dos diferentes genótipos antes de se proceder à sua caracterização quanto à resposta à indução de ES.

Os resultados obtidos na caracterização citogenética das diferentes linhas de plantas confirmaram a sua ploidia. As plantas das linhas T1, T2 e T3, resultaram de um tratamento de indução de tetraploidia com agentes c-mitóticos (Antunes, 2010). Contudo, aquando da confirmação da ploidia destas plantas, pela contagem do número

de cromossomas, verificou-se que as plantas da linha T3 apresentavam células com o cariótipo diplóide $2n=2x=24$ (Lopes *et al.*, 2000) e células com o cariótipo tetraplóide $2n=4x=48$, em contraste com as plantas das linhas T1 e T2 que apresentaram ambas um cariótipo tetraplóide. As plantas da linha T0, funcionaram como controlo nos ensaios realizados, uma vez que eram clones de origem seminal. A observação do cariótipo foi importante para a confirmação da ploidia das diferentes linhas, cuja análise já tinha sido feita por citometria de fluxo (Antunes, 2010), antes do período de micropropagação.

Existem vários métodos referenciados para a identificação de plantas poliplóides (Tandon e Bali, 1957; Pei, 1985; Li e Zhang, 1991; Yang *et al.*, 2006). Estudos anteriores em plantas tetraplóides, espontâneas ou induzidas, têm mostrado que o número de estomas e o número de cloroplastos nas células guarda varia significativamente consoante a ploidia da planta (Tandon e Bali, 1957; Speckmann *et al.*, 1965; Tan e Dunn, 1973; Cohen e Yao, 1996; Beck *et al.*, 2003; Nigel *et al.*, 2007).

Pela contagem dos cloroplastos, os níveis de ploidia das plantas podem ser identificados rapidamente e com uma precisão confiável em algumas espécies, como é o caso do milho (Li e Meng, 1993), da abóbora (Guo e Wang, 2004) e da videira (Zhang, 2005). Noutras, como no pepino (Han *et al.*, 2003), no tabaco (Liu e Huang, 1998) e na couve chinesa (Han *et al.*, 2006) tal não acontece. No caso do tamarilho, verificou-se que há diferenças significativas entre o número de cloroplastos nas células guarda do genótipo diplóide (≈ 20) quando comparados com os genótipos tetraplóides (≈ 35). O número de cloroplastos das plantas mixoplóides não variou do número de cloroplastos das plantas tetraplóides. No futuro, para uma melhor aplicação desta técnica, deverá ser estabelecido um número limite de cloroplastos e, uma relação entre o número de cloroplastos e o número de cromossomas no tamarilho deverá ser estudado.

Ao analisar as características morfológicas das diferentes linhas conseguiu verificar-se que as plantas mixoplóides (T3) apresentam tendencialmente raízes mais compridas e que as plantas tetraplóides têm caules de maior diâmetro, quando comparadas com as plantas diplóides (T0). As plantas tetraplóides, T1, apresentam caules curtos e de maior diâmetro em relação aos outros genótipos. Esta característica pode estar relacionada com a indução de poliploidia, uma vez que este processo é uma das soluções possíveis para a obtenção de características melhoradas, sendo os poliplóides geralmente tidos como superiores às plantas diplóides no que diz respeito à sua capacidade genética, apresentando habitualmente um maior vigor, fertilidade e produção (Shao *et al.*, 2003; Dhooghe *et al.*, 2009). Um exemplo é o facto de a

poliploidia estar associada ao aumento da tolerância ao frio em plantas ornamentais e o aumento da biomassa ou de compostos efectivos para as plantas medicinais (Gao *et al.*, 1996).

Os genótipos T1 vs T2 e T1 vs T3 diferem entre si em relação ao comprimento do caule, no entanto esta característica não é totalmente fidedigna, uma vez que, apesar de todas terem o mesmo tempo de desenvolvimento em cultura, há outros factores, para além da ploidia, que podem interferir com o desenvolvimento das plantas como, por exemplo, a exposição à luz. Contudo, a análise comparada destes dados não parece revelar um padrão evidente que permita correlacionar as diferenças nas características medidas e o nível de ploidia da planta.

Após a caracterização citológica e morfológica, as diferentes linhas foram avaliadas quanto à sua resposta à indução de ES. Em meio de indução com a auxina picloram, explantes foliares derivados das plantas tetraplóides T2 originaram uma taxa de indução de 93%, mas para a outra auxina, 2,4-D, no mesmo genótipo não houve qualquer resposta à indução de ES. Com os resultados deste ensaio, é possível concluir que as plantas de tamarilho tetraplóides poderão ser um genótipo com elevadas taxas de indução de embriogénese somática, sendo as condições de indução um importante factor a ter em conta na optimização dessas taxas de sucesso.

Trabalhos anteriores com o tamarilho contribuíram para o estabelecimento de um protocolo eficiente para a indução de ES (Guimarães *et al.*, 1988, Lopes *et al.*, 2000, Canhoto *et al.*, 2005, Correia, *et al.*, 2009). Contudo, ainda existem pormenores neste protocolo que necessitam de optimização. Um dos objectivos deste trabalho passou pela optimização de alguns pontos nesse protocolo.

Os resultados obtidos relativamente à indução de ES permitem concluir que a auxina mais eficaz para a indução de ES é o picloram, relativamente à auxina 2,4-D. No entanto, é com esta última que os explantes se mantêm em cultura por períodos mais prolongados sem que ocorra novamente a desdiferenciação das células, o que vai de encontro com os resultados obtidos por Correia *et al.* (2009). Em estudos anteriores de indução de ES no tamarilho, foram testadas várias concentrações de uma outra auxina, NAA, e os melhores resultados (43,3% de indução) foram obtidos com 2,0 mg/l da hormona, mesmo que várias concentrações desta auxina (0,1 – 10 mg/l) sejam capazes de promover a indução de ES (Guimarães *et al.*, 1996). Em contraste com os resultados obtidos com o NAA, quando embriões zigóticos, ou secções de folhas de plantas com 4 ou 6 semanas de crescimento, são colocados em cultura na presença de 2,4-D ou

picloram, é induzido um calo de crescimento lento após 4-6 semanas de cultura (Lopes *et al.*, 2000; Maia, 2002; Correia *et al.*, 2012b). Quando o tecido embriogénico obtido é transferido para um meio de cultura desprovido de auxina dá-se a diferenciação desse tecido em embriões somáticos. A estes embriões estão normalmente associadas muitas anomalias morfológicas que a literatura descreve estarem relacionadas com a frequente má formação do meristema apical (Corredoira *et al.*, 2003; Stasolla e Yeung 2003; Hussain *et al.*, 2009), no entanto, quando se dá a conversão em plântulas, estas apresentam um desenvolvimento normal. Resultados prévios com o tamarilho (Lopes *et al.*, 2000), e com outras espécies (Canhoto *et al.*, 1999; Correia e Canhoto, 2010) demonstraram que as células dos embriões somáticos são frequentemente vacuolizadas, levando por isso a uma fraca capacidade na acumulação de substâncias de reserva durante a maturação, acarretando impactos negativos no desenvolvimento do embrião (Correia *et al.*, 2012b).

A indução de embriogénese somática no tamarilho, tal como noutras espécies, é estimulada por condições de stresse (Ferreira *et al.*, 1997; Gatita e Almeida, 2003). A observação de que a exposição dos explantes a condições ambientais adversas pode ser favorável à indução de ES é um argumento a favor da interpretação da ES como um caso extremo de adaptação ao stresse. De entre esses factores de stresse salienta-se o protocolo utilizado, que é um tratamento com elevadas concentrações de auxinas. Apesar disso, há autores que referem que outras condições de stresse são igualmente capazes de estimular a formação de embriões somáticos (Galiba e Yamada, 1988; Carlotto, 2000; Gatita e Almeida, 2003). A fim de testar diferentes condições de stresse na indução de ES, resultantes do tempo de manutenção no mesmo meio de cultura e da fonte de carbono utilizada, foram realizados alguns ensaios com a linha diplóide T0 e a auxina 2,4-D a 2 mg/l.

Nos resultados obtidos para a indução de ES nas plantas diplóides com diferentes concentrações de sacarose associadas ao meio de cultura, o tratamento S1, onde a concentração de sacarose foi combinada com igual concentração de manitol (4,5% + 4,5%), foi o que permitiu a maior taxa de indução. O efeito positivo de altas concentrações de sacarose na indução de ES foi descrito para outras plantas lenhosas (Muralidharan *et al.*, 1989; Canhoto e Cruz, 1994; Lopes *et al.*, 2000). Alguns autores apontam ainda o facto dos hidratos de carbono poderem apresentar um efeito duplo na cultura de plantas, actuando como fonte de carbono e como regulador osmótico (Mauri e Manzarena, 2003), pelo que, um ajuste adequado das fontes de carbono do meio de

indução consiste numa importante optimização no sentido da obtenção de melhores taxas de indução.

O tempo de manutenção dos explantes no meio de indução de ES revelou ser também um factor importante no sucesso deste procedimento. Nos tratamentos em que o meio foi renovado semanalmente e de 2 em 2 semanas não houve uma resposta positiva quanto à indução de ES, o que reforça mais uma vez o facto de todo este processo ocorrer sob condições de stresse. Estes resultados revelam, em concordância com resultados obtidos anteriormente, que para a diferenciação do explante em tecido embriogénico é necessária a produção de auxinas endógenas (Canhoto *et al.*, 2005), o que não acontece se o meio suplementado com auxinas for renovado entre períodos de tempo curtos. A presença de ácido ascórbico no meio revelou ser um componente-estímulo para a indução de ES, verificando-se uma taxa de sucesso em todos os tratamentos, com excepção do AS5 (2 g/l de ácido ascórbico), superior à obtida no controlo. O ácido ascórbico é um suplemento frequentemente utilizado em protocolos de indução de embriogénese somática. Os resultados alcançados neste trabalho mostraram estar em conformidade com os obtidos por Ahmed *et al.* (2011) com *Phyllanthus nodiflora*, onde a taxa mais elevada de formação de calo embriogénico se verificou em meio base MS com auxinas (2,4-D ou NAA) suplementado com ácido ascórbico. Em contraste, Pinto *et al.* (2008) descreveu que a presença de ácido ascórbico no meio pode funcionar como um agente oxidante, reduzindo o potencial de indução de ES em *Eucalyptus globulus*.

4.3. Estabelecimento de suspensões celulares

No desenvolvimento dos protocolos de indução de ES e de obtenção de embriões somáticos, no sentido da sua aplicabilidade enquanto técnica de propagação clonal em larga escala, são vários os parâmetros cuja optimização contribui para aumentos significativos na eficácia da técnica.

O recurso à cultura de células com capacidade embriogénica em suspensões celulares apresenta-se como um procedimento utilizado para o rápido incremento em massa nos protocolos de ES de algumas espécies (Chawla, 2010; Mustafa *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2011; Pavoković *et al.*, 2012), nomeadamente espécies com interesse económico elevado, como algumas solanáceas (Fieger *et al.*, 2002; Vargas *et al.*, 2005).

Nos trabalhos descritos por Vargas *et al.* (2005), o sistema de indução de embriogénese somática em secções internodais do caule da batata, em meio líquido, permitiu obter um rendimento de aproximadamente 600 embriões somáticos por 50 ml de meio de cultura.

No sistema de embriogénese somática do tamarilho, a fase de proliferação das células embriogénicas induzidas é de extrema importância no rendimento obtido em termos da quantidade de embriões somáticos produzidos. Quanto maior a massa de tecido embriogénico viável proliferado, maior será a potencialidade da técnica para obter um grande número de embriões somáticos e conseqüentemente plantas. Neste trabalho procurou-se desenvolver um protocolo otimizado para o incremento em massa do tecido embriogénico obtido durante a fase de proliferação, através de suspensões celulares. Com esse objectivo, um dos ensaios realizados consistiu na análise da cinética do crescimento das suspensões celulares, verificando-se que as massas embriogénicas colocadas a crescer num maior volume de meio (20 ml) apresentam maiores e mais rápidos incrementos, ao fim das 3 subculturas (em períodos de 3 semanas), em comparação com as massas que foram colocadas a crescer em 10 ml de volume de meio. Este facto pode estar relacionado com a relação massa de células / volume de meio, uma vez que uma menor quantidade de inóculo leva a uma fase *lag* mais longa e, por contraste, quanto maior for a quantidade do inóculo mais precoce será a fase estacionária (Mustafa *et al.*, 2011). No segundo ensaio com suspensões celulares, no qual o objectivo foi a optimização da razão massa/volume em cultura, os resultados também se encontram em concordância com estas observações. Verificou-se que para o menor volume (10 ml) só as menores massas (10 e 20 mg) cresceram durante as 3 subculturas, possibilitando a determinação do incremento 3, enquanto as massas maiores apresentavam sinais de morte celular, possivelmente devida da saturação do meio após a segunda subcultura em igual volume de meio. Para o maior volume testado (20 ml) só com as maiores quantidades de células embriogénicas (50 mg) é que se verificou um decréscimo da segunda (incremento 2) para a terceira subcultura (incremento 3), verificando-se para as massas menores incrementos sucessivos, revelando que o meio não saturou tão rapidamente como o meio de 10 ml de volume. Assim, pôde verificar-se que volumes maiores de meio são mais apropriados para a cultura de suspensões celulares com inóculos maiores, sendo a razão massa/volume óptima obtida neste ensaio a de $\approx 40\text{mg}$ de massas embriogénicas / 20ml de meio de cultura.

Ambos os ensaios realizados nesta fase do trabalho foram acompanhados por um tratamento controlo, no qual ocorreu o crescimento contínuo em meio sólido das células em 15 ml de meio sólido, em tubos de ensaio. Os resultados obtidos neste controlo apresentaram incrementos em massa significativamente mais elevados do que as suspensões celulares, o que contradiz a literatura, onde alguns autores defendem que este último método é mais adequado à rápida propagação de células em larga escala (Yang *et al.*, 2011). Face a estes resultados pode concluir-se que as condições utilizadas na obtenção das suspensões celulares de massas embriogénicas de tamarilho deverá ainda ser optimizada, devendo-se futuramente repetir o ensaio, tendo em conta a razão massa/volume agora encontrada, e averiguar se a fase *lag* se prolonga, aumentando assim o incremento das células em suspensão.

No terceiro ensaio com suspensões celulares utilizaram-se diferentes linhas de calo (CEV, CEG e CNEB) com o objectivo de analisar a aplicação das suspensões celulares, não apenas na propagação em massa de células embriogénicas, mas também na análise das secreções que estas células possam produzir para o meio de cultura. Assim, procurou obter-se suspensões celulares em condições de cultura suficientemente homogéneas para que se conseguisse observar diferenças, em termos proteicos, entre culturas de células com e sem capacidade embriogénica. Observou-se que as linhas celulares sem capacidade embriogénica (CNEB) secretaram maior quantidade de proteínas para o meio de cultura quando comparadas com as linhas com capacidade embriogénica normal (CEV) ou reduzida (CEG), o que está de acordo com a bibliografia (Pavoković *et al.*, 2012). Já no que diz respeito ao teor proteico das células, trabalhos anteriores com o tamarilho (Correia *et al.*, 2012a), revelam que células com capacidade embriogénica apresentam um teor proteico mais elevado que as células sem capacidade embriogénica. No resultado da análise proteica houve amostras para as quais não se conseguiu detectar proteínas - as amostras resultantes da extracção de proteínas a partir dos extractos totais das suspensões de CEV e CEG (CEVt e CEGt). À excepção destas duas amostras, para todas as outras foi possível detectar proteínas, sendo as derivadas dos extractos obtidos das secreções de CNEB as detectadas em maior quantidade e diversidade.

O recurso a uma etapa de concentração de proteínas, durante o processo de extracção, revelou-se mais eficiente, sobretudo para as amostras com menor teor proteico, como os extractos de CEV e CEG, para os quais o processo de extracção a partir da amostra total deverá ainda ser optimizado. As amostras provenientes da cultura

de calo não embriogénico (CNEB) têm maior diversidade de bandas, sendo estas também mais intensas. Este facto pode estar relacionado com o tempo que as células estiveram em cultura. Oropeza *et al.* (2001) defende que, como o calo embriogénico é mais compacto, conseqüentemente necessita de mais tempo para libertar células isoladas para o meio, em contraste com o calo não embriogénico, cuja consistência é mais friável e as células são facilmente separadas quando colocadas em suspensão. Uma outra razão que pode explicar a menor secreção de proteínas pelas amostras CEV e CEG do que pelas amostras CNEB são as características citológicas de cada tipo de células: o calo embriogénico (CEV e CEG) tem uma actividade metabólica elevada, com elevados níveis de proteínas e outros componentes citoplasmáticos, em contraste com o calo não embriogénico (CNEB), cujas células são muito vacuolizadas e com reduzida actividade metabólica (Orpeza *et al.*, 2001). Os resultados revelaram ainda que os perfis proteicos das três amostras em estudo são diferentes, observando-se a presença exclusiva de proteínas de ≈ 10 kDa e ≈ 50 kDa para as amostras dos extractos CNEBt e CNEB, e proteínas de ≈ 25 kDa restritas às amostras CEV e CEG, o que também já tinha sido observado por Vargas *et al.* (2005) na análise de proteínas das suspensões celulares de *Solanum tuberosum*. Neste trabalho procurou-se, pela primeira vez no tamarilho, a optimização do processo de extracção das proteínas secretadas para o meio de cultura, sendo o passo seguinte, após se conseguir um bom método de extracção, a identificação das diferentes proteínas através da análise por espectrometria de massa.

Protocolos eficientes para a proliferação de células embriogénicas são de extrema importância em sistemas de embriogénese somática como o do tamarilho, pelo facto de possibilitarem análises moleculares e de metabolitos, mas também por contribuírem para o aumento do número de células que podem ser utilizados para propagação em massa ou para aplicação em protocolos de transformação genética.

4.4. Transformação genética de calo embriogénico

Apesar do aumento do número de sucessos na transformação genética, a produção de plantas transgénicas continua difícil e limitada a um reduzido número de espécies e genótipos, especialmente para as espécies lenhosas, que se apresentam normalmente recalcitrantes à transformação genética (Ribas *et al.*, 2011). Vários

métodos de transformação têm sido descritos em algumas espécies, incluindo a abordagem balística (McCown *et al.*, 1991), a electroporação de protoplastos (Chupeau *et al.*, 1994) e co-cultura com *Agrobacterium*. A transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* tem sido considerado o protocolo mais adequado para o desenvolvimento em larga escala de plantas transgênicas com um transgene de integração simples (Busov *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011).

Em 1993, Atkinson e Gardner estabeleceram um protocolo para a transformação do tamarilho e verificaram que a eficiência da transformação pode ser influenciada por vários factores. Surekha *et al.* (2007) observaram, na transformação de *Cajanus cajan*, que esses factores podem ser a adição de acetoceringona (20 μ M) às culturas bacterianas, os genótipos, as estirpes de *Agrobacterium*, diferentes tipos de explantes, e o tempo de co-cultura com a bactéria. A acetoceringona tem mostrado melhorar a eficiência da transformação em várias espécies (Godwin *et al.*, 1991), embora tenham sido descritos diferentes períodos de pré-cultura específicos para diferentes espécies (Schmidt e Willmitzer, 1988; Atkison e Gardner, 1991).

Nos protocolos de transformação de tamarilho, nem sempre a transformação é alcançada com sucesso, sendo as razões para esta variabilidade pouco claras. Atkison e Gardner (1993) referiam o tipo de explantes e o seu estado de desenvolvimento como uma característica muito importante nos resultados obtidos. Em estudos anteriores na batata-doce, foi o calo embriogénico que se revelou como o explante mais adequado para uma elevada taxa de eficiência na transformação genética (Gama *et al.*, 1996, Otani *et al.*, 1998, 2001). Em tamarilho, apenas se encontra referência a trabalhos que utilizaram como explante na transformação secções foliares (Atkinson e Gardner, 1993; Cohen *et al.*, 2000) ou explantes foliares previamente induzidos em meio de indução de embriogénese somática (Correia, 2011).

Nos ensaios de transformação realizados neste trabalho o calo embriogénico CEV foi usado como explante. Este calo foi transformado recorrendo-se a três estirpes diferentes de *Agrobacterium*, possuindo todas o plasmídeo p35SGUSINT, a fim de verificar qual a estirpe mais eficaz na transformação de calo embriogénico de tamarilho. Nos resultados obtidos para a coloração GUS verificou-se que a transformação genética foi mais eficiente com a estirpe C58C1, apresentando as massas embriogénicas uma tonalidade azul mais intensa. Apesar de os níveis de expressão transiente do GUS após a inoculação com a *Agrobacterium* terem sido baixos, foi possível verificar a presença de células transformadas para todas as estirpes. Alguma literatura refere que o tratamento

por vácuo pode aumentar a capacidade de infecção, sendo que nos ensaios descritos de maior sucesso na transformação foi usada esta técnica (Yang *et al.*, 2011). A análise da eficiência das estirpes através da quantificação das massas embriogénicas resistentes à canamicina vai de encontro ao resultado obtido com a coloração GUS, uma vez que é a estirpe C58C1 que apresenta a maior percentagem de células resistentes a canamicina.

A transformação foi também comprovada por PCR, a partir da extracção de DNA de massas embriogénicas resistentes à canamicina, ao fim de 6 semanas em meio de selecção. Os resultados indicaram, para todos os calos embriogénicos transformados com as diferentes estirpes de *Agrobacterium*, a amplificação dos fragmentos do *nptII* e do *gusA*. Como controlo desta reacção procedeu-se também à amplificação de fragmentos do gene *nptI*, obtendo-se um resultado positivo, o que indica que as amostras apresentavam ainda material genético bacteriano. Este resultado talvez possa ser evitado se, nos próximos ensaios, o período de cultura em meio de selecção for aumentado.

A disponibilidade de um protocolo eficiente para a transformação genética no tamarilho é muito importante, uma vez que poderá permitir a introdução de características úteis agronomicamente nas melhores variedades muito rapidamente. Neste contexto, é importante estabelecer procedimentos de transformação baseados nos tecidos alvo. Assim, este trabalho foi uma contribuição para esse passo, uma vez que permitiu a transformação de culturas embriogénicas. São necessárias várias optimizações no protocolo seguido neste trabalho, de modo a que se consiga uma eficiência mais elevada na transformação. Em ensaios próximos, é necessário dar continuidade a todo este processo, abordando um protocolo de regeneração de plantas transformadas.

5.CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS



A otimização de protocolos de indução de ES para um uso eficiente em espécies lenhosas é um passo muito importante para o desenvolvimento de novos cultivares e para a propagação de árvores elite em grande escala. A compreensão dos mecanismos de regulação molecular da indução de ES pode ajudar no desenvolvimento de novas abordagens com vista a essa otimização e ainda melhorar os sistemas de transformação em espécies lenhosas. Contudo, há ainda muitas limitações associadas à aplicação da ES, como é o caso da recalcitrância do material adulto quando induzido, o desenvolvimento assíncrono dos embriões, a proliferação contínua de calo e ainda a presença frequente de embriões anómalos. Um dos principais objectivos deste trabalho passou pela otimização do protocolo de indução de ES no tamarilho. Para alcançar este objectivo foram adoptadas as seguintes estratégias: i) caracterização da resposta de diferentes génotipos (previamente caracterizados citológica e morfológicamente) face à indução de ES, ii) utilização de diferentes auxinas como reguladores de crescimento e em diferentes concentrações e iii) comparação da resposta do mesmo génotipo a diferentes condições de stresse durante a indução de ES.

Na caracterização da resposta de diferentes génotipos face à indução de ES observou-se que os génotipos tetraplóides apresentaram, na maioria, uma percentagem de indução mais elevada que o génotipo diplóide. Pôde também concluir-se que condições de stresse, como a disponibilidade de diferentes concentrações de sacarose e a presença de ácido ascórbico no meio, influenciam positivamente a indução de ES. Em contraste, menor tempo de manutenção do meio de cultura parece influenciar negativamente a indução. Contudo, serão necessários mais ensaios e, serem testadas mais condições de stresse para que haja mais resultados concordantes quanto à caracterização da resposta face à indução de ES.

Neste trabalho foi estabelecido, pela primeira vez, um protocolo de multiplicação de células embriogénicas de tamarilho através de suspensões celulares. Foi avaliada a cinética de crescimento das células embriogénicas e determinada uma razão massa/volume favorável ao crescimento continuado das culturas. Foi em maiores volumes de meio líquido de cultura, com as maiores massas, onde se obteve um maior incremento em massa, estabelecendo-se a razão 40 mg células / 20 ml de meio como uma razão optimizada para o eficiente incremento de células embriogénicas de tamarilho em suspensões celulares. No entanto, deverão ser realizados, futuramente, mais testes, com outros volumes de meio e outras variáveis, que possam confirmar se a razão massa/volume obtida neste trabalho é de facto adequada a um leque alargado de

situações, permitindo às células em suspensão um rápido crescimento, sem que ocorra morte celular.

No trabalho realizado foi ainda explorado o potencial das suspensões celulares na pesquisa de substâncias reguladoras do processo de ES no tamarilho. A análise dos perfis proteicos das secreções de três tipos diferentes de células (embriogénicas, embriogénicas com reduzida capacidade e não embriogénicas) permitiu constatar uma maior diversidade e quantidade de proteínas secretadas pelas células não embriogénicas, para o protocolo de extracção realizado. Futuramente, este protocolo de extracção de proteínas deverá ser optimizado, de modo a torná-lo mais eficiente e aplicável à identificação das proteínas detectadas através da espectrometria de massa.

No sentido de desenvolver um protocolo mais eficiente para a transformação genética do tamarilho, utilizou-se, pela primeira vez, como explante, calo embriogénico, aliando a elevada capacidade de multiplicação deste tipo de tecido à natural aptidão da *Agrobacterium tumefaciens* para transformar células vegetais. De três estirpes testadas, a estirpe C58C1, foi a que se revelou mais eficiente na transformação, pela maior percentagem de massas de células resistentes à canamicina e pela expressão da β -glucuronidase. Contudo, deverão realizar-se mais ensaios, de forma a optimizar o protocolo no sentido de obter taxas de transformação mais elevadas. Os resultados obtidos com este trabalho permitiram a obtenção de linhas de células embriogénicas transformadas, cuja importância advém do seu potencial para a regeneração de plantas transformadas. A regeneração dessas plantas deverá portanto ser o passo seguinte a ser dado em trabalhos futuros, de forma a concluir este protocolo de transformação genética de calo embriogénico de tamarilho.

No global, o conjunto de trabalhos realizado contribuiu para a optimização dos protocolos de indução de ES em génotipos de tamarilho com potencial interesse, não só pela avaliação de diferentes condições de cultura na resposta obtida, mas também pelo desenvolvimento de um protocolo para a cultura de suspensões celulares de células embriogénicas de tamarilho, com potencial aplicabilidade na propagação em massa de génotipos de interesse, em protocolos de transformação genética, bem como na de investigação das vias de regulação molecular do processo de indução ES.

6. REFERÊNCIAS



-
- Ahmed ABA, Rao AS, Rao MV, Taha RM (2011) Effect of picloram Additives and Plant Growth Regulators on Somatic Embryogenesis of *Phyla nodiflora* (L.) Greene. Braz Arch Biol Technol. 54:7-13.
- Allard R (1999) Principles of Plant Breeding. John Wiley & Sons, Inc New York.
- Antunes P (2010) Indução de plantas tetraplóides através de tratamento com agentes c-mitóticos no tamarilho (*Cyphomandra betacea*) e no medronheiro (*Arbutus unedo*). Tese de mestrado. Universidade de Coimbra.
- Atkinson RG, Gardner RC (1991) *Agrobacterium*-mediated transformation of pepino and regeneration of transgenic plants. Plant Cell Rep. 10: 208-212.
- Atkinson RG, Gardner RC (1993) Regeneration of transgenic tamarillo plants. Plant Cell Rep 12: 347 -351.
- Barghchi M (1986) *In vitro* rejuvenation of *Cyphomandra betacea* (tamarillo). Plant Physiology Division Biennial Report, Department of Scientific and Industrial Research (DSIR), New Zealand, pp. 52.
- Barghchi M (1998) *In vitro* regeneration, plant improvement and virus elimination of tamarillo [*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt]. In: MR Davey, PG Alderson, KC Lowe, JB Power (Eds.) Tree Biotechnology – Towards the Millennium. Nottingham, Nottingham University Press, pp. 173-185.
- Beck SL, Dunlop RW, Fossey A (2003) Stomatal length and frequency as a measure of ploidy level in black wattle, *Acacia mearnsii* (de Wild). Botanical Journal of the Linnean Society 41: 177–181.
- Bois D (1927) Les plantes alimentaires, vol I. Paris, Ed. Paul Lechevalier.
- Bonga JM, Klimaszewska K, von Aderkas P (2010) Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. Plant Cell Tiss Org Cult. 100: 241-254.
- Brown D, Thorpe T (1995) Crop improvement through tissue culture. World Journal of Microbiology & Biotechnology 11: 409-415.

REFERÊNCIAS

- Busov VB, Strauss SH, Pilate G (2010) Transformation as a Tool for Genetic Analysis in *Populus*. In: S Jansson *et al.*, (eds) Genetics and Genomics of *Populus*. Plant Genetics and Genomics. DOI 10.1007/978-1-4419-1541-2_6.
- Canhoto JM (1994) *Feijoa sellowiana* Berg. (Myrtaceae): Estudos Sobre Embriogénese e Outros Tipos de Morfogénese. Tese de Doutoramento, FCTUC.
- Canhoto JM (2010) Biotecnologia Vegetal da Clonagem de Plantas à Transformação Genética. Imprensa da Universidade de Coimbra. Coimbra.
- Canhoto JM, Correia SI, Marques CI (2009) Factors affecting somatic embryogenesis induction and development in *Feijoa sellowiana* Berg. Acta Hort 839: 147 - 156.
- Canhoto JM, Cruz GS (1996) *Feijoa sellowiana* Berg (Pineapple Guava). In: YPS Bajaj (Ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol 35, Trees IV, Berlin, Springer Verlag, pp. 155-171.
- Canhoto JM, Lopes ML, Cruz GS (1999) Somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle (Myrtaceae). Plant Cell Tiss Org 57: 13-21.
- Canhoto JM, Lopes ML, Cruz GS (2005) Protocol for somatic embryogenesis: tamarillo (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.). In: SM Jain, PK Gupta (Eds.) Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody plants, Dordrecht, Springer, pp. 379-389.
- Canhoto JM, Rama S, Cruz GS (2006) Somatic embryogenesis and plant regeneration in carob (*Ceratonia siliqua* L.). *In vitro* Cell Dev Biol 42: 514 –519.
- Carloto J (2000) Estudo de processos moleculares associados à embriogénese somática em *Cyphomandra betacea*. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular, Departamento de Botânica, Universidade de Coimbra.
- Cassells AC, Doyle BM (2006) Pathogen and Biological Contamination Management. In: Loyola-Vargas VM, Vázquez-Flota F (Eds) Plant Cell Culture Protocols (2nd Ed) Totowa, New Jersey. Humana Press, pp 35-50.
- Catalogue of Life, <http://www.catalogueoflife.org/> (Acedido a 16/06/2011).

-
- Cervera M, Juárez J, Navarro A, Pina JA, Durán-Vila N, Navarro L, Peña L (1998) Genetic transformation and regeneration of mature tissues of woody fruit plants bypassing the juvenile stage. *Transgenic Research* 7: 51-59.
- Chawla HS (2010) *Introduction to Plant Biotechnology* (3^a Ed). Science Publishers, Inc Enfield, NH, USA.
- Chrispeels M J, Sadava DE (2003) *Plants, Genes and Crop Biotechnology* (2nd Ed). Cap.5. pp 100-123.
- Chupeau MC, Pautot V, Chupeau Y (1994) Recovery of transgenic trees after electroporation of poplar protoplasts. *Transgenic Res* 3:13–19.
- Cohen D, Elliot D (1979) Micropropagation methods for blueberries and tamarillos. *Comb Proc Int Plant Prop Soc* 29: 177-179.
- Cohen D, van den Brink RC, MacDiarmid RM, Beck DL, Forster RL (2000) Resistance to tamarillo mosaic virus in transgenic tamarillos and expression of the transgenes in F1 progeny. *Acta Hort* 521: 43 -49.
- Cohen D, Yao JL (1996) In vitro chromosome doubling of nine *Zantedeschia* cultivars. *Plant Cell Tiss Org* 47: 43–49.
- Corredoira E, Ballester A, Vieitez AM (2003) Proliferation, maturation and germination of *Castanea sativa* Mill. somatic embryos originated from leaf explants. *Ann Bot* 92:129–136.
- Correia S (2011) Somatic embryogenesis in *Cyphomandra batatea* (Cav.) Sendt (tamarillo): optimization and molecular analysis. Tese de doutoramento. Universidade de Coimbra.
- Correia S, Canhoto JM (2010) Characterization of somatic embryo attached structures in *Feijoa sellowiana* Berg. (Myrtaceae). *Protoplasma* 242: 95–107.
- Correia S, Vinhas R, Manadas B, Lourenço AS, Veríssimo P, Canhoto JM (2012) Comparative Proteomic Analysis of Auxin-Induced Embryogenic and Nonembryogenic Tissues of the Solanaceous Tree *Chyphomandra batatea* (Tamarillo). *J Proteomic Res* 11: 1666-1675. **a**

- Correia SI, Lopes ML, Canhoto JM (2009) Somatic embryogenesis in tamarillo (*Cyphomandra betacea*): recent advances. *Acta Hort* 839: 157 -164.
- Correia SI, Lopes ML, Canhoto JM (2011) Somatic embryogenesis induction system for cloning an adult *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (tamarillo). *Trees* 25: 1009-1020.
- Correia SI, Lopes ML, Canhoto JM (2012) Somatic embryogenesis induction system for cloning an adult *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (tamarillo). *Plant Cell Tiss Org* 109: 143-152. **b**
- Cruz FP, Tomé MC (2007) *Agrobacterium*-mediated transformation of tamarillo plants. *Proc of Plant Transformation Technology*, Vienna, Austria.
- Darlington CD, La Cour LF (1976) *The Handling of Chromosomes*, sixth ed. London: George Allen & Unwin Ltd. p 125-6.
- De Rosso VV, Mercadante AZ (2007) HPLC-PDA-MS/MS of anthocyanins and carotenoids from dovyalis and tamarillo fruits. *J Agric Food Chem* 55: 9135 -9141.
- Dhooghe E, Grunewald W, Leus L, Labeke M (2009) In vitro polyploidization of *Helleborus* species. *Euphytica* 165: 89-95.
- Etienne H (2005) Somatic embryogenesis protocol: coffee (*Coffea Arabica* L. and *C. canephora* P.). In: Jain SM, Gupta PK (eds) *Protocol for somatic embryogenesis in woody plants*, Springer, Dordrecht, pp.167-179.
- Ferreira A, Matsubara L (1997) Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e stress oxidatixo. *Ver. Ass. Med. Brasil*, 43: 61-68.
- Fieger AK, Mix-Wagner G, Vorlop KD (2002) Regeneration of *Solanum tuberosum* L. cv. Tomes. Induction of somatic embryogenesis in liquid culture for the production of artificial seed. *Landbauforsch. Volk* 50: 199-200.
- Figuroa F, Avalos R, Vargas V (2006) Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tiss Org Cult* 86: 285-301.

- Galiba G, Yamada Y (1988) A novel method for increasing the frequency of somatic embryogenesis in wheat tissue culture by NaCl and KCl supplementation. *Plant Cell Rep* 7: 55-58.
- Gama MICS, Leite RP Jr, Cordeiro AR, Cantliffe DJ (1996) Transgenic sweetpotato plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Cell Tiss Org Cult* 46: 237-244.
- Gao SL, Zhu DN, Cai ZH, Xu DR (1996) Autotetraploid plants from colchicine-treated bud culture of *Salvia miltiorrhiza* Bge. *Plant Cell Tiss Org Cult* 47: 73-77.
- Gatita IC, Almeida J (2003) Micropropagación del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.), Solanaceae silvestre usada en la alimentación humana. *Revista Forest Venez* 47: 9-13.
- Gautheret RJ (1939) Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercule de carotte. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 208: 118-120.
- Godwin I, Todd G, Ford-Lloyd B, Newbury HJ (1991) The Effects of acetosyringone and pH on *Agrobacterium*-mediated transformation vary according to plant species. *Plant Cell Rep* 9: 671-675.
- Guimarães M, Tomé M, Cruz G (1996) *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (Tamarillo). Em: Bajaj, Y. (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Trees IV*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 120-137.
- Guimarães ML, Cruz GS, Montezuma-de-Carvalho JM (1988) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. *Plant Cell Tiss Org Cult* 15: 161-167.
- Guo YQ, Wang JS (2004) Study on methods for ploidy determination in regenerated plant from unpollinated ovules of *Cucurbita pepo*. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica* 19: 80-83.
- Han Y, Ye XL, Feng H (2006) Study on ploidy variation and ploidy identification of microspore-derived plants in Chinese cabbage. *China Vegetables* 11: 9-11.
- Han YK, Du SL, Wang M (2003) Study on chromosome preparation and ploidy in cucumber. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 18: 72-74.

- Hartmann H, Kester DE, Davies FT, Geneve RL (1997) Plant propagation: principles and practices (6th Ed.). Prentice-Hall International. London.
- Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA (1983) A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*, 303: 179-180
- Hood EE, Gelvin SB, Melchera LS, Hoekema A (1993) New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgen Res*, 2: 208-218.
- Hurtado NH, Morales AL, González -Miret ML, Escudero-Gilete ML, Heredia FJ (2009) Color, pH stability and antioxidant activity of anthocyanin rutosides isolated from tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). *Food Chem* 117: 88-93.
- Hussain S, Rao A, Husnain T, Riazuddin S (2009) Cotton somatic embryo morphology affects its conversion to plant. *Biologia Plantarum* 53:307–311.
- Irninger M (2003) A Evolução da Agricultura – da Idade Média à Era Pré-industrial. In: Os Genes e a Alimentação. E V Schärer – Züblin (Ed.) Foundation Alimentarium. pp. 38-46.
- Jefferson R A (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* 5: 387–405.
- Jiménez V (2005) Involvement of plant hormones and plant growth regulators in *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation*, 47:91-110.
- Kadota M, Niimi Y (2002) *In vitro* induction of tetraploid plants from a diploid Japanese pear cultivar (*Pyrus pyrifolia* N. cv. Hosui). *Plant Cell Reports* 21: 282-286.
- Kane ME (2005) Shoot culture procedures. In: Trigiano, R. N. e Gray, D. J. (Eds.) *Plant Development and Biotechnology*. CRC Press. Boca Raton.
- Kimaszewska K, Overton C, Setwaet D, Rutledge RG (2011) Initiation of somatic embryos and regeneration of plants from primordial shoots of 10-years-old somatic white spruce and expression profiles of 11 genes followed during the tissue culture process. *Plant* 233: 635-647.

- Kou M, Yen J, Hong J, Wang C (2008) *Cyphomandra betacea* Sendt. phenolics protect LDL from oxidation and PC12 cells from oxidative stress. *LWT – Food Sci Technol* 42: 458-463.
- Lewis D, Considine J (1999) Pollination and fruit set in the tamarillo (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.) 1 - Floral biology. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 27: 101-112.
- Li CH, Meng XQ (1993) Anther culture and ploidy identification of regenerated plants of corn. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica* 8: 64-68.
- Li MX, Zhang XF (1991) *Plant Chromosome Technology*. Northeast Forestry University Publisher, Harbin, pp. 48-118.
- Litz RE, Gray DJ (1995) Somatic embryogenesis for agricultural improvement. *World J Microbiol Biotechnol* 11: 416-425.
- Liu RX, Huang Y (1998) Early, quick determination of chromosome polyploidy of anther culture derived of tobacco plant. *Guizhou Agricultural Sciences*, 26, 4-7.
- Lopes ML, Ferreira MR, Carloto JM, Cruz GS, Canhoto JM (2000) Somatic embryogenesis induction in tamarillo (*Cyphomandra betacea*). In: SM Jain, PK Gupta, RJ Newton (Eds.) *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, vol. 6. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, pp. 433 -455.
- Loyola-Vargas VM, Vázquez-Flota F (2006) An Introduction to Plant Cell Culture: Back to the Future. In: Loyola-Vargas VM, Vázquez-Flota F (Eds) *Plant Cell Culture Protocols Second Edition*. Totowa, New Jersey. Humana Press, pp 3-8.
- Maia JM (2002) Tamarillo plant regeneration through somatic embryogenesis from adult micropropagated shoots. Master Thesis, University of Coimbra, Coimbra, Portugal.
- Mauri PV, Manzanera JA (2003) Induction maturation and germination of holm oak (*Quercus ilex*L.) somatic embryos. *Plant Cell Tiss Org* 74:229–235.
- McCane J, Widdowson DA (1992) In: *Fruit and nut (Suppl. To the composition of foods.)* 5th Ed. London, Holland, Unwin & Buss, pp. 74 -77.

- McCown BH, McCabe DE, Russell DR, Robison DJ, Barton KA (1991) Stable transformation of *Populus* and incorporation of pest resistance by electric discharge particule acceleration. *Plant Cell Rep* 9:590–594.
- Meadows LR (2002) Growing tamarillo relatives. In: *The New Zealand Home Garden*. www.naturalhub.com. Acedido em Abril de 2012.
- Merkle SA, Parrot WA, Flinn BD (1995) Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: TA Thorpe (Ed.) *In vitro* Embryogenesis in Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp.155-203.
- Mertz C, Brat P, Caris-Veyrat C, Günata Z (2009) Impact of thermal treatment coupled with oxygen level on carotenoids and vitamin C degradations of tamarillo puree (*Solanum betaceum* Cav.). *Food Chemistry*.
- Montoya J, Escobar R, Debouck D (2000) Development of a freezing methodology in liquid nitrogen of tree tomato (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.) seeds. *Centro Internacional de Agricultura Tropical*, pp 5.
- Morton J (1982) The tree tomato, or “tamarillo”, a fast-growing, early-fruiting small tree for subtropical climates. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 95: 81-85.
- Morton JF (1987) Tree Tomato. In: JF Morton (Ed.) *Fruits of Warm Climates*. Miami, FL, pp. 437-440.
- Mossop DW (1977) Isolation, purification and properties of tamarillo mosaic virus, a member of the potato virus Y group. *N Z J Agr Res* 20: 535-541.
- Muralidharan EM, Gupta PK, Mascarenhas AF (1989) Plantlet production through high frequency somatic embryogenesis in long term cultures of *Eucalyptus citriodora*. *Plant Cell Rep* 8:41-43.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473 -497.
- Mustafa NR, de Winter W, van Iren F, Verpoorte R (2011) Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nature America*. DOI:10.1038/nprot.2010.144.

- Nigel ARU, Jennie H, Therese M (2007) Generation and characterization of colchicine-induced autotetraploid *Lavandula angustifolia*. *Euphytica* 156: 257–266.
- Obando M, Goreux A, Jordan M (1992) Regeneration *in vitro* de *Cyphomandra betacea* (tamarillo), una especie frutal andina. *Ciencia e Investigacion Agraria* 19: 125-130.
- Obando M, Jordan M (2001) Regenerative responses of *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (tamarillo) cultivated *in vitro*. *Acta Hort* 560: 429-432.
- Oropeza M, Marcano AK, García ED (2001) Proteíns related with embryogenic potential in callus and cell suspensions of sugarcane (*Saccharm* sp.) *Plant* 37: 211-216.
- Otani M, Shimada T, Kimura T, Saito A (1998) Transgenic plant production from embryogenic callus of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnol* 15: 11-16.
- Otani M, Wakita Y, Shimada T (2001) Genetic transformation of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Hort* 560: 193-196.
- Pais MSS (2003) Biotecnologia Vegetal. In: Lima N, Mota M (Eds.) Biotecnologia – Fundamentos e Aplicações. Lidel. Lisboa. pp. 401-427.
- Pavoković D, Poljuha D, Horvatić A, Ljubešić N, Hagege D, Krsnilk-Rasol M (2012) Morphological and proteomic analyses of sugar beet cultures and identifying putative markers for cell differentiation. *Plant Cell Tiss Org* 108: 111-119.
- Pei XS (1985) Polyploidy induction and breeding. Shanghai Science and Technology Press.
- Pinto S, Silva S, Park Y, Neves L, Araújo C, Santos C (2008) Factors influencing somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globulus* Labill.: basal medium and anti-browning agents. *Plant Cell Tiss Org* 95:79-88.
- Pintos B, Manzanera J, Bueno M (2007) Antimitotic agents increase the production of double-haploid embryos from cork oak anther culture. *Journal of Plant Physiology* 164: 1595-160.

- Prohens J, Nuez F (2001) The tamarillo (*Cyphomandra betacea*): a review of a promising small fruit crop. *Small Fruits Review* 1: 43-68.
- Raghavan V (1986) *Embryogenesis in Angiosperms – A developmental and experimental study*. Cambridge University Press, London.
- Raghavan V, Sharma, KK (1995) Zygotic embryogenesis in gymnosperms and angiosperms. In: T.A. Thorpe (Ed.), *In vitro embryogenesis in Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 73-115.
- Rajarjo, SHT, Litz RE (2007) Somatic embryogenesis and plant regeneration of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) from leaves of mature phase trees. *Plant Cell Tiss Org Cult*. 89:113-119.
- Reinert J (1958) Untersuchungen über die morphogenese an gewebeulturen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 71:15.
- Ribas, AF, Dechamp E, Champion A, Dertrand B, Combes M-C, Verdeil J-L, Lapeyre F, Lashermes P, Etienne H (2011) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Coffea Arabica* (L.) is greatly enhanced by using established embryogenic callus cultures. *BMC Plant Biology* 11: 92.
- Robledo-Paz A, Vázquez-Sánchez MN, Adame-Alvarez RM, Jofre-Garfias AE (2006) Callus and Suspension Culture Introduction, Maintenance and Characterization. In: Loyola-Vargas VM, Vázquez-Flota F (Eds) *Plant Cell Culture Protocols Second Edition*. Totowa, New Jersey. Humana Press, pp 59-70.
- Sánchez-Romero C, Márquez-Martin B, Pliego-Alfaro F (2006) Somatic and zygotic embryogenesis in avocado. In: Mujib A, Šamaj J (eds) *Somatic embryogenesis*. Springer, Berlin, pp.271-284.
- Schmidt R, Willmitzer I (1988) High efficiency *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* leaf and cotyledon explants. *Plant Cell Rep*. 7: 583-586.
- Shao J, Chen C. Deng X (2003) In vitro induction of tetraploid in pomegranate (*Punica granatum*). *Plant Cell Tiss Org* 75: 241-246.

- Sharma MK, Solanke AU, Jani D, Singh Y, Sharma AK (2009) A simple and efficient *Agrobacterium*-mediated procedure for transformation of tomato. *J. Biosci.* 34: 000-000.
- Speckmann GJ, Post JJ, Dijkstra H (1965) The length of stomata as an indicator for polyploidy in rye grasses. *Euphytica* 14, 225–230.
- Stasolla C, Yeung EC (2003) Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant Cell Tiss Org* 74:15–35.
- Steward FC, Mapes MO, Mears K (1958) Growth and organized development of cultured cells. II Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Am. J. Bot* 45: 705-708.
- Surekha Ch, Arundhati A, Seshagiri Rao G (2007) Differential response of *Cajanus cajan* varieties to transformation with different strains of *Agrobacterium*. *Journal of Biological Sciences* 7(1): 176-181.
- Tan GY, Dunn GM (1973) Relationship of stomatal length and frequency and pollen grain diameter to ploidy level in *Bromus inermis* Leyss. *Crop Science* 13: 332–334.
- Tandon SL, Bali PN (1957) Morphological and cytological studies of the diploid and the colchicine-induced tetraploid in *Linaria vulgaris*. *Genetica* 29: 101–109.
- Thorpe TA, Stasolla C (2001) Somatic Embryogenesis. In: SS Bhojwani, WY Soh (Eds.) *Current Trends in the Embryology of Angiosperms*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, pp. 279 -336.
- Tomé MC, Guimarães ML, Cruz GS (1992) Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. Abstr 1st Congresso Hispano - Luso de Biotecnologia, Santiago de Compostela, Spain.
- Toribio M, Celestino C, Molinas M (2005) Cork oak, *Quercus suber* L. In: Jain SM, Gupta PK (eds) *Protocol for somatic embryogenesis in woody plants*, Springer, Dordrecht, pp. 445-457.
- Trigiano RN, Gray DJ (2005) *Plant Development and Biotechnology*. CRC Press. Boca Raton. pp. 145-157.

- Umehara M, Kamada H (2005) Development of the embryo proper and the suspensor during plant embryogenesis. *Plant Biotechnology*, 22: 253-260.
- Van Larebeke N, Engler G, Holsters M, Van den Elsacker S, Zaenen I, Schilperoort R A, Schell J (1984). Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall inducing ability. *Nature*, London. 252:169-170.
- Vancanneyt G, Schmidt R, O'Connor-Sanchez A, Willmitzer L, Rocha.Sosa M (1990) Construction of an intron-containing marker gene: Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol Gen Genet*, 220: 245-250.
- Vargas TE, García ED, Oropeza (2005) Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* from cell suspension cultures: histological analysis and extracellular protein patterns. *Journal of Plant Physiology* 162: 449-456.
- Varghese JM, Bhat AI (2011) An Efficient *Agrobacterium*-Mediated Transformation Protocol for Black Pepper (*Piper nigrum* L.) Using Embryogenic Mass as Explant. *J Crop Sci Biotech* 14(4): 247-254.
- Vidal N, Mallón R, Valladares S, Meijomín AM, Vieitez AM (2010) Regeneration of transgenic plants by *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos of juvenile and mature *Quercus robur*. *Plant Cell Rep* 29: 1411-1422.
- von Arnold S (2008) Somatic Embryogenesis. In: George EF, Hall MA, Klerk D (eds) *Plant propagation by tissue culture* (3^a ed) Vol. I. The background. Springer, Dordrecht, pp. 335-354.
- Went FW (1926) On growth accelerating substances in the coleoptile of *Avena sativa*. *Proc. Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam*, 30:10.
- Williams EG, Maheswaran G (1986) Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Ann Bot* 57: 443 – 462.
- Yang J, Bi H-P, Fan W-J, Zhang M, Wang H-X, Zang P (2011) Efficient embryogenic suspension culturing and rapid transformation of a range of elite genotypes of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam.). *Plant Science* 181: 701-711.

- Yang XM, Cao ZY, An LZ, Wang YM, Fang XW (2006) In vitro tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Euphytica* 152: 217–224.
- Zhang J, Zhang M, Deng X (2007) Obtaining autotetraploids *in vitro* at a high frequency in *Citrus sinensis*. *Plant Cell Tiss Org* 89: 211-216.
- Zhang LY, Guo QG, Li XL, Zeng H, Tan JM, Liang GL (2005) Study on the relationship between the number of chloro-plast in stomata guard cell and the ploidy of loquat cultivars. *Journal of Fruit Science* 22: 229-233.
- Zimmerman JL (1993) Somatic Embryogenesis: A Model of Early Development in Higher Plants. *The Plant Cell*, 5: 1411-1423.