



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Embriogénese somática em solanáceas: integração de sistemas modelo alternativos baseados no tamarilho

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 (Universidade de Coimbra).

Patrícia Morais Fernandes

2014

Imagens de capa: <http://www.kew.org/mng/gallery/062.html>;
<http://janedautant.deviantart.com/>

Earth laughs in flowers.

Ralph Waldo Emerson

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus orientadores a quem estou verdadeiramente grata, não só por este desafio mas também por acreditarem e investirem em mim desde o início do meu percurso. Ao meu orientador, Professor Doutor Jorge Canhoto, a quem devo gratidão pela orientação e por todas as oportunidades com que me presenteou desde a minha integração no Laboratório de Biotecnologia Vegetal (ainda no decorrer da minha licenciatura), que foram verdadeiramente importantes no meu desenvolvimento pessoal. À minha orientadora, Doutora Sandra Correia, um sincero obrigada pela ajuda em todos os meus passos laboratoriais, pelo incentivo, paciência e amizade.

Não poderia aqui faltar a nossa querida, e sempre companheira, D. Eulália Rosa, cujo auxílio laboratorial foi imprescindível em todos os momentos. O mesmo se aplica aos meus colegas de laboratório que me fizeram sentir integrada desde o primeiro dia. Agradeço à Sara pelo tempo despendido na ajuda com a extração e quantificação de amido, ao Rui pela inextinguível boa disposição, sempre contagiante, e um especial agradecimento aos meus queridos Ana e João, que sempre me apoiaram em todas as vertentes, pessoais e académicas.

Às minhas *migas* Mariana Roxo e Ana Rita Carvalho pelas vidas exauridas que partilhamos, preenchidas por fantásticos momentos de procrastinação (que nunca eram suficientes).

À Marnoco e Sousa (Valérie Branco, Patrícia Pereira, Mariana Neto e Filipa Quadros) que me viu crescer. Um especial agradecimento à Valérie por ter assumido quase que um papel de mãe quando o tempo era de “aperto”.

Ao Bruno que apesar da distância esteve sempre tão perto.

À minha família, não são necessárias palavras.

ÍNDICE

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Biotecnologia Vegetal – princípios e aplicações	3
1.2. Solanaceae	4
1.2.1. Caracterização, contextualização económica e biotecnológica.....	4
1.2.2. Solanáceas com interesse económico e/ou biotecnológico: o caso da beringela, da pera-melão e do tamarilho	7
1.2.3. Propagação e cultura <i>in vitro</i>	13
1.3. A importância dos sistemas modelo na compreensão da morfogénese vegetal	19
1.4. Objetivos e contextualização	26
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
2.1. Comparação dos sistemas de indução de ES em beringela, pera-melão e tamarilho.....	31
2.1.1. Estabelecimento <i>in vitro</i> e material vegetal.....	31
2.1.2. Indução de ES.....	32
2.1.3. Maturação, germinação e aclimação de embriões somáticos	38
2.1.4. Análise da expressão da NEP-TC nos tecidos induzidos através de RT-PCR	39
2.2. Avaliação morfogénica de linhas de <i>Arabidopsis thaliana knockout</i> para genes da família das SpoU metiltransferases de RNA	40
2.2.1. Material vegetal e condições de cultura	40
2.2.2. Seleção de plantas homozigóticas para a inserção do T-DNA.....	41
2.2.3. Indução de ES	42
2.2.4. Observação do desenvolvimento morfológico	43
3. RESULTADOS	45

3.1.	Estabelecimento <i>in vitro</i> de linhas policlonais de beringela, pera-melão e tamarilho.....	47
3.2.	Indução de ES em explantes foliares de beringela, pera-melão e tamarilho ...	49
3.2.1.	Indução de ES em beringela	49
3.2.2.	Indução de ES em pera-melão	54
3.2.3.	Indução de ES em tamarilho.....	56
3.2.4.	Observação citológica e quantificação da acumulação de hidratos de carbono nas células induzidas.....	58
3.3.	Maturação, germinação e aclimação de embriões somáticos	60
3.3.1.	Beringela.....	60
3.3.2.	Tamarilho	64
3.4.	Análise dos níveis de expressão da NEP-TC nos tecidos induzidos	65
3.5.	Indução de ES em linhas de <i>Arabidopsis thaliana knockout</i> para genes da família das SpoU metiltransferases de RNA	67
3.5.3.	Observação do desenvolvimento morfológico	71
4.	DISCUSSÃO	75
4.1.	Estabelecimento <i>in vitro</i> de linhas policlonais de beringela, pera-melão e tamarilho.....	77
4.2.	Indução de ES em explantes foliares de beringela, pera-melão e tamarilho ...	78
4.3.	Maturação, germinação e aclimação de embriões somáticos	83
4.3.1.	Beringela.....	83
4.3.2.	Tamarilho	85
4.4.	Análise dos níveis de expressão da NEP-TC nos tecidos induzidos das solanáceas e indução de ES em linhas de <i>Arabidopsis thaliana knockout</i> para genes da família das SpoU metiltransferases de RNA	86
4.4.1.	Observação do desenvolvimento morfológico	87
5.	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	89
6.	REFERÊNCIAS	93

RESUMO

A disponibilidade de sistemas modelo de embriogénese somática (ES) permitiu criar ferramentas vantajosas para o estudo de processos de diferenciação celular vegetal e para aumentar o nosso entendimento sobre os aspetos funcionais dos genes já implicados na ES. Vários sistemas modelo têm sido amplamente utilizados na caracterização da ES, tais como *Daucus carota* e *Arabidopsis thaliana*. No entanto, as descobertas fundamentadas nestas plantas deverão ser testadas noutros organismos ou sistemas para verificar a sua efetividade. Outras espécies têm demonstrado um papel emergente no entendimento de vários processos morfológicos induzidos *in vitro*, sendo a beringela (*Solanum melongena* L.) e o tamarilho (*Cyphomandra betacea* Cav. Sendt. syn. *Solanum betaceum*) exemplos dessa situação. São dois membros da Solanaceae, uma grande e diversa família de plantas cuja importância económica e interesse biotecnológico são bem conhecidos. A beringela apresenta uma notável resposta a várias técnicas de cultura *in vitro* devido ao grande potencial morfogénico, sendo particularmente vantajosa na indução de ES. A disponibilidade de vários protocolos de ES eficientes, combinados com o número crescente de *loci* identificados, disponíveis em bases de dados, possibilita a consideração do papel desta solanácea como modelo alternativo em estudos da morfogénese *in vitro*. Outra solanácea promissora é o tamarilho, uma espécie lenhosa cujo protocolo de ES já se apresenta otimizado. A grande vantagem do sistema de indução nesta espécie é a formação simultânea de tecidos embriogénicos (CE) e não embriogénicos (CNE) a partir do mesmo explante (folhas ou embriões zigóticos maduros) perante as mesmas condições de cultura. A comparação de perfis proteicos de CE e CNE permitiu a identificação de proteínas expressas diferencialmente durante a aquisição da competência embriogénica, incluindo a NEP-TC (GenBank, accession number JQ766254.1), uma proteína de 26,5 kDa consistentemente presente em CNE, sugerindo um possível papel como inibidor da indução de ES no tamarilho. Esta proteína apresenta um elevado grau de homologia com a família de proteínas SpoU metiltransferases de RNA de *Arabidopsis thaliana*.

No presente trabalho, são analisados os sistemas de indução de ES da beringela e do tamarilho numa abordagem semelhante, de forma a avaliar o seu papel como sistemas modelo alternativos em estudos de ES. Adicionalmente foi estudada outra solanácea, a pera-melão (*Solanum muricatum* Ait.), que apresenta um hábito intermédio entre a beringela e o tamarilho, devido às suas características semi-arbustivas. Numa fase inicial,

pretendeu-se verificar se as condições de indução de ES no tamarilho poderiam ser reproduzidas nesta espécie com potencial para ser explorada comercialmente e da qual ainda pouco se sabe, revelando-se assim interessante para o estabelecimento de novos protocolos de cultura *in vitro*. Neste sentido, foram efetuados ensaios de ES em todas as espécies usando explantes de tecidos foliares de vários genótipos. Foram testadas várias concentrações das auxinas 2,4-D, NAA e picloram e diferentes quantidades de sacarose, 3% e 9% (w/v) para a beringela, e 9% (w/v) para o tamarilho e a pera-melão. Os resultados demonstraram diferentes respostas, tendo os tecidos de beringela e tamarilho permitido obter calo com características embriogênicas e não embriogênicas, ao contrário da peramelão, a partir da qual apenas foi obtido calo com características não embriogênicas. A expressão do gene *NEP-TC* foi analisada em todos os calos obtidos e tecidos foliares de beringela, pera-melão e tamarilho, tendo a abundância dos seus transcritos sido determinada através de RT-PCR. Os resultados obtidos indicaram que os níveis dos transcritos de *NEP-TC* variam em todos os tecidos das solanáceas, com elevada abundância em CNE, mas também em CE, e menor expressão em folhas não induzidas, o que está em concordância com os resultados previamente obtidos no tamarilho. Também foi avaliada a capacidade de indução de ES de linhas de *Arabidopsis thaliana knockout* para genes da família das SpoU metiltransferases de RNA. Plantas homocigóticas para a linha de inserção foram comparadas com plantas *wild type*. Juntamente foram analisados aspectos morfológicos tais como, o enraizamento e o desenvolvimento da roseta e da inflorescência. Os resultados demonstraram uma taxa de indução de ES ligeiramente mais elevada na linha *knockout* para o gene homólogo à *NEP-TC* e, relativamente ao desenvolvimento foram registadas diferenças significativas relativamente ao enraizamento.

A informação reunida neste trabalho permite a correlação entre sistemas de indução de ES de diferentes solanáceas, que possivelmente terão o potencial para contribuir como sistemas modelo alternativos. No entanto, deverão ser efetuados mais estudos no que diz respeito à otimização do protocolo de indução de ES da beringela e ao papel funcional da *NEP-TC* tanto na beringela como no tamarilho. Esta proteína estará possivelmente envolvida na indução de ES como um marcador da competência não-embriogênica e poderá auxiliar na compreensão dos mecanismos de regulação deste processo.

PALAVRAS-CHAVE: *Arabidopsis thaliana*, calo embriogénico, calo não embriogénico, *Solanum melongena*, *Solanum muricatum*.

ABSTRACT

The availability of somatic embryogenesis (SE) model systems has created effective tools for studying cell differentiation processes in plants thus increasing our understanding about the functional aspects of genes implicated on SE. Over the years, several models such as *Daucus carota* and *Arabidopsis thaliana* have been widely used to characterize SE. However, the effectiveness of the discoveries based on such plants is often difficult to be verified in other systems. In recent years, other species have demonstrated an emerging role for the understanding of various *in vitro* induced morphological processes. This is the case of eggplant (*Solanum melongena* L.) and tamarillo (*Cyphomandra betacea* Cav. Sendt. syn. *Solanum betaceum*), two members of Solanaceae, a large and diverse plant family whose economic importance and biotechnological interest are well known. Eggplant is very responsive to numerous tissue culture techniques due to a high morphogenic potential that is particularly useful for SE induction. The availability of several efficient SE protocols, combined with an increasing number of identified *loci* available on databases, makes this solanaceous an alternative model to be considered for studies of *in vitro* morphogenesis. Another promising solanaceous is tamarillo, a tree species in which effective SE protocols have been developed. One of the main advantages of tamarillo is the simultaneous formation of embryogenic (EC) and non-embryogenic (NEC) tissues from the same explant (leaves or mature zygotic embryos) under the same culture conditions. Comparative proteomic analysis of EC and NEC allowed the identification of proteins differentially expressed during the acquisition of SE competence including NEP-TC (GenBank, accession number JQ766254.1), a 26.5 kDa protein consistently present in NEC, suggesting its putative role as an inhibitor of tamarillo's SE induction. This protein shows a high degree of identity with the *Arabidopsis thaliana* RNA methyltransferase (SpoU) family protein.

In the present study eggplant and tamarillo SE induction systems were analyzed in a combined approach to testify their role as alternative model systems for SE studies. Additionally another solanaceous, pepino (*Solanum muricatum* Ait.), with an intermediate habit between eggplant and tamarillo, due to its semi-shrub characteristics, was studied. In an initial step, it was intent to reproduce the SE induction conditions for tamarillo. Little is known about this Solanaceae with potential to be explored commercially, revealing itself interesting for the establishment of new protocols of *in vitro* culture. For this purpose SE was induced in all species using explants from leaf

tissues from several genotypes. The assays involved SE induction on media containing different concentrations of the auxins 2,4-D, NAA or picloram and different sucrose levels, 3% and 9% (w/v) for eggplant, and 9% (w/v) for tamarillo and pepino. The results showed distinct responses, however, in both eggplant and tamarillo, responsive and non-responsive *calli* could be obtained, unlike pepino that only give rise to non-responsive tissues. All cell masses were analyzed in relation with the expression of *NEP-TC*. The abundance of *NEP-TC* transcripts in several tissues of eggplant, pepino and tamarillo was determined through RT-PCR analyses. The results showed that *NEP-TC* transcripts levels vary in a similar way in all the solanaceous tissues, with high abundance in NEC, but also in EC and lower expression in non-induced leaf samples, which is in accordance with previous results obtained with tamarillo. Homozygous plants of knockout lines of *Arabidopsis thaliana* were also evaluated for their ability to undergo SE, when compared to the wild type controls. Morphogenetic aspects, such as rooting, rosette and inflorescence development were also compared. The results showed a slightly higher rate of SE the homologous gene of *NEP-TC* knockout line and in terms of development significant differences were registered regarding the rooting process.

The information gathered in this work, allows a correlation between the SE induction of different solanaceous species that possibly have the potential to contribute as alternative model systems. However further studies should be focused on the optimization of eggplant's SE induction protocol and the functional role of *NEP-TC* on both tamarillo and eggplant. This protein is possibly involved in the induction of SE as a marker of non-embryogenic competence and could help to understand the regulatory mechanisms of this process.

KEY WORDS: *Arabidopsis thaliana*, embryogenic *calli*, non-embryogenic *calli*, *Solanum melongena*, *Solanum muricatum*.

1. INTRODUÇÃO



1.1. Biotecnologia Vegetal – princípios e aplicações

A Biotecnologia Vegetal, pelo seu potencial de utilização e otimização dos recursos vegetais, é crucial para o aumento da produção agrícola mundial. O aperfeiçoamento destas novas tecnologias, e a sua aplicação ao desenvolvimento de sistemas de propagação de plantas, apresenta-se como uma área com inúmeras potencialidades e possibilidades de exploração científica e socioeconómica (Canhoto, 2010).

A cultura *in vitro*, incluída na vasta área da Biotecnologia Vegetal, representa um sistema vantajoso no estudo de diferentes processos na fisiologia vegetal (Loyola-Vargas e Vázquez-Flota, 2006). Esta técnica consiste no estabelecimento e manutenção, em condições laboratoriais, de células, tecidos, órgãos vegetais, plantas ou massas de células (*callus*), em condições assépticas e controladas (Canhoto, 2010; Chawla, 2010).

A micropropagação de plantas foi a primeira aplicação, a nível industrial, da tecnologia de cultura *in vitro*. Os protocolos de micropropagação visam a rápida multiplicação de plantas geneticamente iguais à planta mãe, sendo induzida a proliferação de tecidos meristemáticos em resposta a tratamentos hormonais (Loyola-Vargas e Vázquez-Flota, 2006). Os métodos de micropropagação de plantas podem ocorrer por três processos, sendo estes a proliferação de meristemas existentes no explante inicial (meristemas apicais do caule ou axilares), neoformação de gemas (indução de organogénese) e produção de embriões somáticos (Chawla, 2010).

A embriogénese somática (ES) é um processo que ocorre através da produção em massa de embriões, partindo de células ou estruturas somáticas (células do corpo – *soma*), tais como embriões zigóticos (imaturos, maduros ou os seus órgãos), explantes de diferentes órgãos da planta, protoplastos ou células em suspensão (Loyola-Vargas e Vázquez-Flota, 2006; Canhoto, 2010). A formação de embriões a partir de células somáticas é uma evidente demonstração da totipotência que alguns tipos celulares manifestam (Figuerola *et al.*, 2006). No entanto, esta capacidade de produzir embriões morfológica e fisiologicamente normais, através do processo de embriogénese somática, é uma competência única dos organismos do Reino Vegetal (Zimmerman, 1993). A embriogénese somática permite, não só a clonagem e propagação vegetativa de determinadas plantas mas também, servir como um sistema modelo para estudos moleculares, citológicos, fisiológicos e dos padrões de desenvolvimento relativos à embriogénese das plantas (Fehér *et al.*, 2003; Figuerola *et al.*, 2006). O maior sucesso, até

agora atingido, para compreender os mecanismos envolvidos na determinação e progresso da embriogénese somática nas plantas foi conseguido através de plantas modelo (Jiménez, 2005) e acredita-se que análises de expressão genética durante este processo possam providenciar informação que ajude a compreender melhor esta metodologia (Yang e Zhang, 2010).

Entre as plantas com grande potencial económico e científico temos as da família Solanaceae. Este grupo engloba plantas que providenciam alimento, drogas e plantas ornamentais (Gunn e Gaffney, 1974). Há muito tempo que é vista como um grupo de grande interesse para vários investigadores, produtores e consumidores (Mueller *et al.* 2005). E de facto, a sua incrível diversidade morfológica e química, a fundamental importância económica e distribuição mundial fazem das solanáceas um dos grupos mais fascinantes de plantas com flor (<http://solanaceaesource.org/>).

1.2. Solanaceae

1.2.1. Caracterização, contextualização económica e biotecnológica

The nightshade family é uma enorme família de plantas com cerca de 3000 a 4000 espécies, das quais a maioria (1000 a 2000 espécies) pertence ao género *Solanum* (http://solanaceaesource.org). Grande parte das espécies deste género são endémicas do continente americano, no entanto, 20% são espécies do Velho Mundo (Doganlar *et al.*, 2002a).

Os espécimes pertencentes a esta família são extremamente diversificados em termos de hábito, morfologia e ecologia, variando desde árvores ou arbustos a trepadeiras, lianas, epífitas e ervas anuais. Morfológicamente apresentam uma variação surpreendente nas características das suas flores e frutos (<http://solanaceaesource.org/>) (Figs. 1 e 2).

É o terceiro *taxon* de plantas mais importante economicamente e o que detém a maior variedade de espécies com utilidade agrícola (Mueller *et al.*, 2005), incluindo a batateira (*Solanum tuberosum*), a beringela (*Solanum melongena*), o tomateiro (*Solanum lycopersicum*), os pimenteiros (*Capsicum* spp.), a planta do tabaco (*Nicotiana tabacum*), plantas ornamentais como a petúnia (*Petunia hybrida*) e ainda plantas medicinais, como por exemplo a datura (*Datura* spp.) (Mueller *et al.* 2005). Para além destas espécies, existem também frutícolas menos conhecidas, como por exemplo a pera-melão (*Solanum*

muricatum), a *naranjilla* (*Solanum quitoense*), o *tomatillo* (*Physalis philadelphica*), e o tamarilho (*Cyphomandra betacea* syn *Solanum betaceum*) (Bohs, 1989).

A evolução das solanáceas, juntamente com um nível excepcionalmente alto de conservação da organização do genoma, torna-as sistemas modelo para explorar a base da diversidade fenotípica e adaptação aos ambientes naturais e agrícolas (<http://solgenomics.net/>). Alguns destes sistemas modelo são importantes organismos experimentais, com grande interesse científico, incluindo o tomateiro para o estudo do amadurecimento de frutos e mecanismos de defesa, a planta do tabaco para estudos de morfogénese e transformação genética e a petúnia para a análise da biologia dos pigmentos antociânicos (<http://solgenomics.net/>). Outro organismo experimental importante na família das solanáceas é o tamarilho, na compreensão dos aspetos particulares relacionados com a aquisição de capacidade embriogénica nos tecidos sujeitos ao processo de indução de ES (Correia e Canhoto, 2012).

A indiscutível importância económica destas espécies tornou-as alvo de intensivos estudos de genómica. A sequenciação do genoma do tomateiro, publicada recentemente (The Tomato Genome Consortium, 2012), fez parte do *International Solanaceae Genome Project* (SOL). Este projeto, que envolve 14 países, tem como principal objetivo decifrar o genoma e dados de expressão de várias solanáceas, de forma a permitir a comparação da arquitetura do seu genoma numa perspetiva de género e família (Fig. 3). Espera-se que a integração da taxonomia, filogenia, e genómica das Solanaceae as coloque entre os géneros e famílias de plantas mais compreendidos, possibilitando uma contribuição para o bem-estar do ser humano através do melhoramento de solanáceas importantes para a humanidade. Este projeto terá impacto não só na biologia das solanáceas, mas também poderá abrir portas para implementar novas estratégias para o melhoramento de outras espécies importantes na nutrição do ser humano (<http://solgenomics.net/solanaceae-project>).

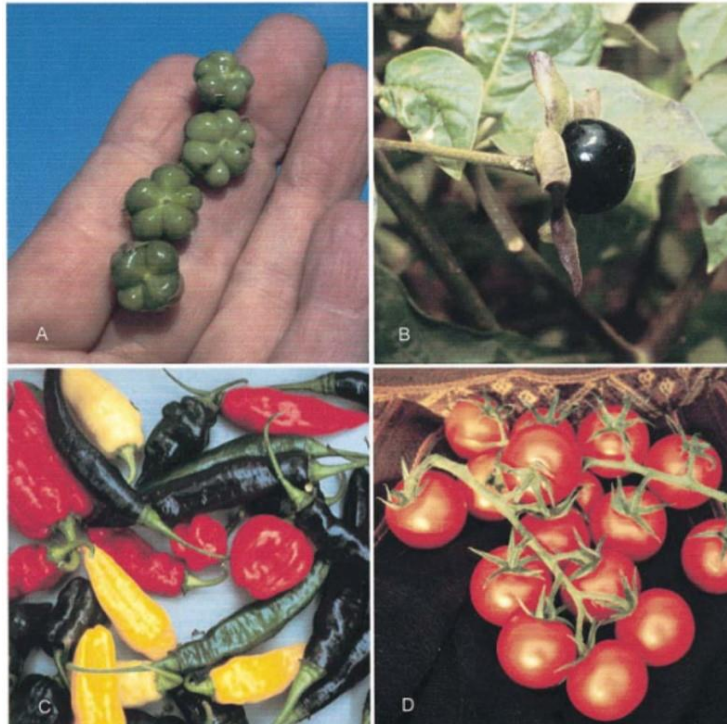


Figura 1. Alguns tipos de fruto representativos das Solanaceae. (A) *Nolana carnosa*; (B) *Atropa belladonna*; (C) *Capsicum* spp; (D) *Solanum lycopersicum* (Knapp, 2002).



Figura 2. Exemplos da diversidade floral nas Solanaceae. (A) *Schizanthus pinnatus*; (B) *Cestrum psittacinum*; (C) *Hyoscyamus niger*; (D) *Solanum peruvianum* (Knapp et al., 2004).

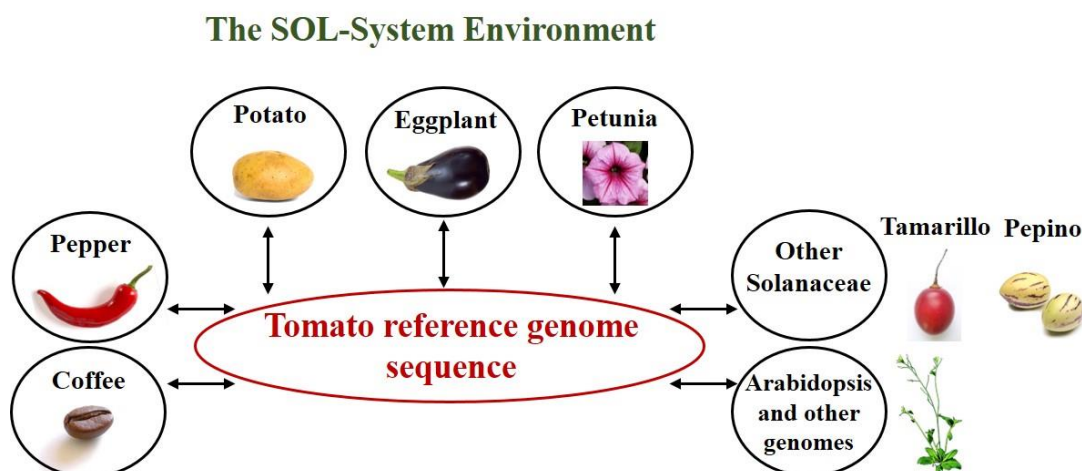


Figura 3. Representação esquemática do conceito e objetivo do programa SOL (adaptado de <http://solgenomics.net>).

1.2.2. Solanáceas com interesse económico e/ou biotecnológico: o caso da beringela, da pera-melão e do tamarilho

Do grande grupo que é a família das solanáceas foram selecionadas para o presente trabalho as solanáceas, beringela (*Solanum melongena* L.), pera-melão (*Solanum muricatum* Ait.) e tamarilho (*Cyphomandra betacea* Cav. Sendt. syn. *Solanum betaceum*).

A beringela, uma planta não tuberosa, (Fári *et al.*, 1995b; Kantharajah e Golegaonkar, 2004), foi domesticada na região asiática abrangida pela China, Índia e Tailândia (Doganlar *et al.*, 2002b), onde é cultivada há mais de 1500 anos (Kashyap *et al.*, 2003). O seu interesse alargou a área de distribuição à parte norte e ocidental da África, bacia do Mediterrâneo e, eventualmente, à Europa durante as conquistas Árabes iniciadas no século VII (Doganlar *et al.*, 2002b). Atualmente é cultivada por todo o globo (Fig. 4A), sendo uma solanácea com um grande impacto económico (Doganlar *et al.*, 2002a).

As suas variedades selvagens são espinhosas e produzem frutos pequenos e amargos. No entanto, da seleção que ocorreu durante a sua domesticação, emergiram cultivares com menos espinhos e frutos grandes e saborosos (Doganlar *et al.*, 2002b). A beringela é um dos vegetais mais importantes no mundo, incluído na dieta diária de muitas pessoas (Doganlar *et al.*, 2002a; Corral-Martínez e Seguí-Simarro, 2012), o que se reflete

no facto da sua produção mundial, referente a 2012, ter sido de cerca de 50 mil milhões toneladas, correspondentes a uma área de cultura de cerca de 1 milhão e oitocentos mil ha, ocupando assim o 7º e 9º lugar no *ranking* dos vegetais, relativamente a estes parâmetros, respetivamente (FAOSTAT, 2014). Nos últimos 10 anos os países europeus que mais contribuíram para a produção de beringela foram os situados na zona mediterrânica, principalmente Espanha e Itália. No entanto, o continente asiático é o principal produtor desta solanácea, sendo responsável por cerca de 94% da produção mundial no ano 2012 (FAOSTAT, 2014). É consumida principalmente na China e na Índia, onde é considerada *the king of vegetables* (Doganlar *et al.*, 2002a).

Paralelamente ao consumo de frutos economicamente importantes e implementados no mercado, novos frutos exóticos têm ganho interesse por parte dos consumidores Europeus, e espera-se que a quota no mercado pertencente a este tipo de frutos cresça fortemente nos anos que se avizinham (Prohens *et al.*, 2000). Pera-melão e tamarilho são duas solanáceas provenientes de um dos maiores centros de biodiversidade de plantas comestíveis do mundo, a região dos Andes, e que se encontram incluídas no grupo que se convencionou chamar de NUC's (*Neglected or Underutilized Crops*), por englobar vários cultivares tradicionais do passado, importantes na alimentação nos sectores mais pobres da sociedade, mas que são hoje em dia negligenciados ou subutilizados. O tamarilho e a pera-melão surgiram de uma involução que criou um aumento da vulnerabilidade da agricultura e empobrecimento da dieta do ser humano e, apesar do seu potencial na prática agrícola, não são devidamente explorados (Bermejo e León, 1994).

A pera-melão é também conhecida por *pepino* ou *pepino-dulce* (Bermejo e León, 1994). *Pepino*, foi o nome dado em inglês, que provém da designação espanhola atribuída à cucurbitácea *Cucumis sativus*, o tradicional pepino. A denominação desta cucurbitácea foi atribuída ao *pepino* visto que os conquistadores espanhóis não encontraram nenhuma planta que fosse mais semelhante (Prohens *et al.*, 1996). A sua área nativa estendia-se ao longo dos Andes (Szyndel *et al.*, 2008), onde é cultivado desde há milhares de anos e onde foi muito importante nos tempos do império Inca (Prohens *et al.*, 1996; 2000). Os primeiros cronistas a descrever a região andina mencionaram frequentemente esta solanácea, que terá chegado ao continente europeu no séc. XVIII (Prohens *et al.*, 1996). Apesar de ter sido um importante cultivar na região dos Andes, nos tempos pré-Colombianos (Prohens *et al.*, 1996), a sua proeminência no séc. XX não atingiu a de outras solanáceas americanas, tais como os pimenteiros, a batateira, o tomateiro e a planta

do tabaco, e permaneceu um cultivar importante apenas a nível local. Por este motivo, a produção de pera-melão foi principalmente dedicada a mercados locais em países andinos como a Colômbia, o Equador, o Perú, a Bolívia e o Chile (Fig. 4B) (Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2011). No entanto, a sua exportação já se realiza para os Estados Unidos e também para países europeus, onde os frutos podem atingir preços elevados (15 €/kg) (Prohens *et al.*, 1996).

O tamarilho é também conhecido por tomate arbóreo, *tree tomato*, *tamarillo* ou *tomate de la paz* (Bermejo e León, 1994). A denominação tamarilho surgiu em 1967, na Nova Zelândia, após 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 (Morton, 1987). O seu sinónimo, *Solanum betaceum*, surge com a transferência das espécies do género *Cyphomandra* para *Solanum* após esclarecimento, através de estudos moleculares, das semelhanças entre espécies dos dois géneros (Bohs, 1995).

O tamarilho é nativo da região dos Andes que inclui o Perú, Chile, Equador e Bolívia (Atkinson e Gardner, 1993; Correia *et al.*, 2011). Dispersou-se para a América central, incluindo as Antilhas, e mais tarde, para as ilhas Portuguesas dos Açores e Madeira e para o sul da Europa (Fig. 4C) (Canhoto *et al.*, 2005). No final do séc. XIX, tinha alcançado Austrália e Nova Zelândia. Os maiores produtores de tamarilho são os EUA (Califórnia), Argentina, Colômbia, Venezuela e Nova Zelândia (Meadows, 2002). Em Portugal, é utilizado sobretudo como planta ornamental, apesar de já terem sido feitas algumas tentativas de exploração comercial dado os elevados preços que atinge no mercado (10 – 15 €/Kg). É cultivado principalmente nas ilhas, mas tem já despertado o interesse de alguns agricultores do continente. No entanto, as baixas temperaturas durante a primavera, outono e inverno podem tornar-se significativas limitações a uma produção em larga escala na nossa região (Guimarães *et al.*, 1996; Lopes *et al.*, 2000). Apesar de ser bastante tolerante a doenças, tal como outras solanáceas, é sensível a nemátodes e a alguns vírus (Correia e Canhoto, 2012), o que também dificulta a sua exploração comercial (Obando e Jordan, 2001).

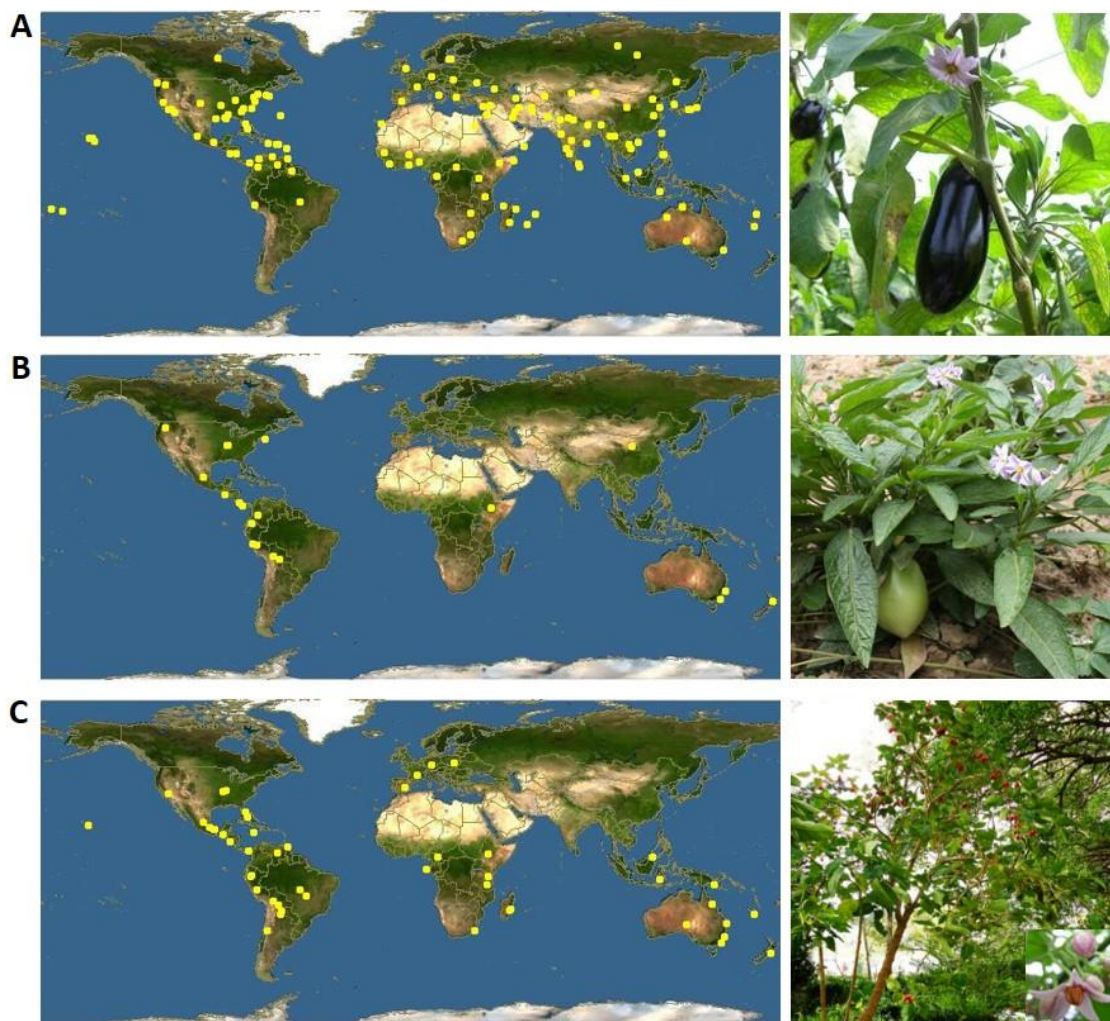



Figura 4. Distribuição mundial e morfologia da planta de (A) beringela, (B) pera-melão e (C) tamarilho (<http://eol.org/>).

As três espécies referidas apresentam diferentes morfologias, sendo que a beringela é uma erva anual, a arbusto perene (podendo atingir os 2 m de altura) (<http://Prota4u.org/>), a pera-melão uma pequena herbácea perene, ou arbusto, bastante ramificada com caule lenhoso (podendo crescer até aos 75 cm de altura) (Nemati *et al.*, 2009) e o tamarilho apresenta-se como uma pequena árvore perene (2 a 4 m de altura) com grandes folhas decíduas (Correia e Canhoto, 2012).

Os frutos também são distintos, tanto na morfologia como na sua composição. Os de beringela são bagas com comprimentos entre os 2 e os 35 cm (por vezes mais) (<http://Prota4u.org/>), diversificando a forma consoante a variedade, sendo que as três principais incluem a beringela em forma de ovo (*S. melongena* var. *esculentum*), a longa e esguia (*S. melongena* var. *serpentium*) e a variedade anã (*S. melongena* var. *depressum*)

(Rajam e Kumar 2007). A cor varia normalmente entre o verde e o roxo, atingindo também o preto (<http://Prota4u.org/>). As características mais proeminentes do fruto da pera-melão são a atrativa aparência e as propriedades derivadas da sua composição química. O exocarpo das variedades mais comuns é amarelo-esbranquiçado, possuindo listras roxas claras, e o seu sabor, quando maduro, é semelhante ao do melão. Quando não se encontra totalmente maduro tanto o sabor, como o odor, são mais semelhantes ao do pepino (Prohens *et al.*, 1996; Cavusoglu e Sulusoglu, 2013). No que diz respeito ao tamarilho, e dependendo do cultivar, os frutos podem ser amarelos, laranjas ou vermelhos, em forma de ovo ou mais arredondados (Correia *et al.*, 2009). As variedades normalmente comercializadas são os vermelhos e amarelos. Os vermelhos são os mais apreciados, dada a sua aparência fascinante e melhor sabor, enquanto os amarelos são mais ácidos com baixos níveis de açúcar (McCane e Widdowson, 1992; Canhoto *et al.*, 2005).

Tabela 1. Composição dos frutos de beringela, pera-melão e tamarilho (Nuez e Ruiz, 1996; Tamarillo Growers Association, 2005; <http://Prota4u.org/>).



Componentes	Unidade	Beringela	Pera-melão	Tamarilho
Água	g	92,7	92,3	87,8
Proteínas	g	0,9	0,3	1,8
Fibras	g	2,3	0,5	3,6
Hidratos de carbono	g	2,2	7	4,3
Ferro	mg	0,3	0,3	0,3
Cálcio	mg	10	30	14,5
Fósforo	mg	16	10	35
Energia	kcal	15	25	36

A composição química dos frutos das três espécies em estudo (Tabela 1) conferem-lhes a sua importância nutricional. A beringela e a pera-melão contêm as vitaminas A e C (Nuez e Ruiz, 1996; Collonnier *et al.*, 2001), enquanto o tamarilho tem um teor relativamente alto em vitamina C e E (Tamarillo Growers Association, 2005). Os frutos da beringela são uma boa fonte de vitaminas e minerais (principalmente ferro), sendo o seu valor nutricional comparável ao do tomate (Kashyap *et al.*, 2003). A pera-melão tem

algumas propriedades medicinais, sendo, por exemplo, um antiescorbútico, graças ao seu elevado conteúdo em vitamina C (Prohens *et al.*, 1996), que se assemelha a alguns citrinos (Jordan *et al.*, 1993).

Os frutos do tamarilho têm um elevado valor nutricional (Canhoto *et al.*, 2005) e para além dos componentes mencionados na Tabela 1 apresentam na sua composição alguns fenóis. Vários estudos têm sido realizados para a avaliação do teor e tipo de antocianinas e carotenoides presentes nos frutos de tamarilho. 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, tanto como fruto como fonte de compostos que eventualmente poderão melhorar a saúde do ser humano (Correia, 2011).

A beringela, a pera-melão e o tamarilho são uma pequena amostra daquilo que a enorme e cativante família das solanáceas pode oferecer. A beringela é uma planta com uma história etnobotânica e biologia bastante fascinantes. É uma solanácea do passado, presente e futuro, cujo melhoramento é de interesse mundial, dada a sua permanente importância na alimentação de pessoas em todo o globo. A pera-melão e o tamarilho têm sido negligenciados ao longo dos anos, no entanto, dado o interesse que tem vindo a surgir por estas duas espécies, espera-se que num futuro próximo estas sejam adicionadas ao grupo de frutos economicamente importantes.

A seleção destas três espécies no presente trabalho relaciona-se com o seu interesse biotecnológico e com a informação já existente para cada uma delas. A beringela, tem um genoma relativamente pequeno, um número de *loci* conhecidos cada vez maior e tem um comportamento interessante em termos de morfogénese *in vitro*. A pera-melão é uma espécie sobre a qual ainda pouco se sabe, revelando-se interessante para o estabelecimento de novos protocolos de cultura *in vitro*. O tamarilho é uma solanácea lenhosa, com um protocolo eficiente de indução de ES já estabelecido e que tem vindo a demonstrar particular interesse como sistema modelo para o estudo da ES (Correia e Canhoto, 2012) (Tabela 2). Estas plantas foram selecionadas em detrimento de outras solanáceas, como por exemplo o tomate e a batata. Apesar de já existir um vasto leque de informação para estas espécies, e mais particularmente para o tomate, devido ao projeto SOL (Fig. 3), ainda não existe um protocolo eficiente de indução de ES. No caso do tomate já foram induzidos embriões somáticos a partir de protoplastos, hipocótilos e

plântulas intactas (Bhatia *et al.*, 2004) e a batata, até finais do séc. XX, era considerada uma espécie recalcitrante (Sharma e Millam, 2004).

O genoma das Solanaceae é singularmente conservado, sendo que não ocorreram eventos de duplicação (como por exemplo poliploidia) na radiação desta família. Eventos de poliploidia (como é o exemplo da batata; Tabela 2) são recentes, indicando sinais de conservação entre genomas já sequenciados. A alta conservação da organização do genoma permite estender a informação base entre as diferentes espécies individuais, criando um mapa comum de conhecimentos entre elas (<http://solgenomics.net/>). Assim, para além das características acima mencionadas, a beringela, o tamarilho e a pera-melão encontram-se interligados filogeneticamente, pertencendo todos ao género *Solanum* (Fig. 5).

Tabela 2. Informação genómica para 5 espécies de solanáceas (<http://solgenomics.net/>).

	Tamarilho <i>S. betaceum</i>	Beringela <i>S. melongena</i>	Pera-melão <i>S. muricatum</i>	Tomate <i>S. lycopersicum</i>	Batata <i>S. tuberosum</i>
Ploidia	2n	2n	2n	2n (a maioria) ou 4n	4n (a maioria) ou 2n
Tamanho do genoma	N/A	1100 Mb	N/A	950 Mb	840 Mb
Nº de cromossomas	24	12	N/A	12	12
Nº de loci conhecidos	N/A	54	N/A	35973	35250

1.2.3. Propagação e cultura *in vitro*

a) Beringela

A propagação de cultivares de beringela é feita essencialmente através de sementes (<http://Prota4u.org/>), embora a enxertia em outras *Solanum* já tenha sido testada (Khah, 2005; Arao *et al.*, 2008). No entanto, a germinação de sementes não assegura a uniformidade genética, o que faz com que não tenha utilidade quando o objetivo é a fixação de características mais vantajosas (Canhoto *et al.*, 2005). Além disso, é necessária uma polinização controlada para a manutenção de linhas puras (<http://Prota4u.org/>) o que por consequência torna a propagação desta espécie uma tarefa árdua através de técnicas tradicionais. Assim, a utilização de técnicas biotecnológicas pode ser uma abordagem alternativa às técnicas de melhoramento convencional permitindo ultrapassar questões

INTRODUÇÃO

como a baixa resistência dos cultivares, as incompatibilidades reprodutoras com *wild relatives* e a condução de genes indesejáveis (Sidhu *et al.*, 2014).

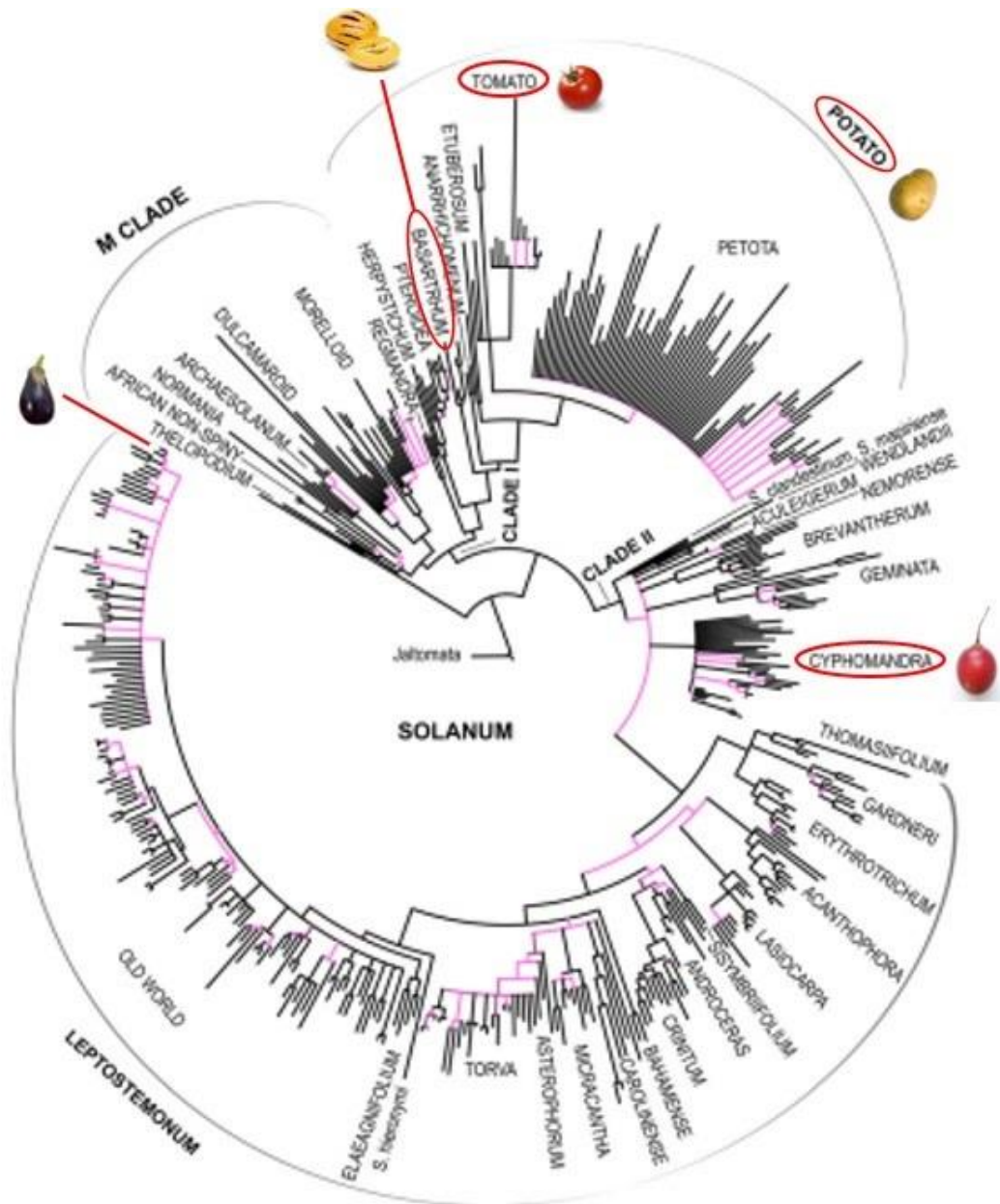


Figura 5. Relações filogenéticas em *Solanum* (adaptado de Särkinen *et al.*, 2013).

A aplicação de metodologias *in vitro* teve bastante sucesso na beringela. Os tecidos desta espécie apresentam um elevado potencial morfogénico, o que é vantajoso em estudos de desenvolvimento, e também no estabelecimento de abordagens biotecnológicas para a produção de novas variedades (Magioli e Mansur, 2005).

Os primeiros estudos de regeneração *in vitro* de beringela foram baseados na cultura de anteras (Isouard *et al.*, 1979), suspensões celulares (Fassuliotis *et al.*, 1981) e protoplastos (Sihachakr *et al.*, 1993). Miyoshi (1996) alcançou a regeneração de beringela partindo de micrósporos isolados, obtendo o desenvolvimento de calo morfogénico, que resultou na produção de haplóides duplos. A sua capacidade de regeneração foi igualmente demonstrada a partir de pecíolos, hipocótilos, folhas, cotilédones e raízes, através da indução de organogénese (Kamat e Rao, 1978; Fassuliotis *et al.*, 1981; Alicchio *et al.*, 1982; Zelcer *et al.*, 1983; Sharma e Rajam, 1995a; Fári *et al.*, 1995a; Magioli *et al.*, 1998) e embriogénese somática (Tabela 3).

A primeira indução de ES na beringela, em 1967 por Yamada *et al.* foi a segunda em solanáceas, precedida pela indução em *Nicotiana tabacum* (Haccius e Lakshmanan, 1965). A indução foi conseguida através da cultura de embriões somáticos imaturos, de dois cultivares diferentes, em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com ácido indol-3-acético (IAA) (Sidhu *et al.*, 2014). Diferentes fatores como o genótipo, tipo de explante e posição, reguladores de crescimento e poliaminas afetam o potencial de regeneração desta espécie via ES (Kantharajah e Golegaonkar, 2004). No que diz respeito aos reguladores de crescimento, a indução de ES na beringela está apenas dependente da aplicação exógena de uma auxina e da sua concentração. A mais comum é o ácido 1-naftalenoacético (NAA) seguida de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Kantharajah e Golegaonkar, 2004). No entanto, a concentração ótima varia com o explante inicial. Por exemplo, enquanto que folhas necessitam de 2-6 mg/l de NAA para que a indução de ES ocorra, hipocótilos requerem 6-10 mg/l (Kashyap *et al.*, 2003). Interações citocinina-auxina, dependendo da sua proporção no meio de cultura, promovem ou inibem o desenvolvimento de rebentos e raízes (Sidhu *et al.*, 2014)

Foi também demonstrado que o tipo de auxina utilizado na indução pode originar variação somaclonal. Analisando várias características morfológicas de plântulas obtidas via ES, foi possível observar variações em culturas com NAA e 2,4-D, com frequências superiores de variação na forma da folha, altura da planta, forma do fruto e fertilidade do pólen com a auxina NAA. Destes resultados concluiu-se que a embriogénese com NAA é mais eficiente e que a variação somaclonal é uma possível fonte de variedade no

melhoramento da beringela (Hitomi *et al.*, 1998). Poliaminas são também importantes reguladores da ES na beringela. A regeneração da beringela através da ES foi melhorada por ajustes favoráveis de concentrações celulares de poliaminas e da proporção entre putrescina e espermidina (Yadav e Rajam, 1997; 1998). As poliaminas desempenham um papel crucial na diferenciação e desenvolvimento celulares, incluindo a ES (Kantharajah e Golegaonkar, 2004).

O genótipo é considerado o fator mais importante associado à resposta embriogénica nesta espécie (Kantharajah e Golegaonkar, 2004). Sharma e Rajam (1995a) compararam genótipos, tipo e posição de explantes na ES utilizando vários cultivares indianos.

b) Pera-Melão

A propagação da pera-melão pode ser feita através de semente (Nemati *et al.*, 2009). Porém, esta planta possui flores hermafroditas e normalmente desenvolve frutos partenocárpicos, juntamente com alguns contendo semente (Ercan e Akilli, 1996). Esta espécie apresenta um elevado nível de heterozigotia, o que faz com que a propagação por semente produza plantas fenotipicamente muito distintas (Prohens *et al.*, 2004). A grande variedade das plantas propagadas por via seminal pode, nesta perspetiva, permitir aos produtores procurar cultivares superiores, que podem ser posteriormente utilizados em programas de melhoramento (Pierik, 1997).

A propagação através de métodos vegetativos pode ser efetuada a partir de estacas, que enraízam facilmente não necessitando de recorrer à utilização de hormonas vegetais, ou através de técnicas de micropropagação *in vitro* (Prohens *et al.*, 2004; Nemati *et al.*, 2009). Apesar de serem poucos os estudos feitos *in vitro*, a pera-melão é uma espécie que poderia beneficiar de tecnologias já desenvolvidas para outras solanáceas (Jordán e Botti, 1992).

A micropropagação é uma técnica de utilização recente na pera-melão (Nemati *et al.*, 2009), existindo poucos protocolos estabelecidos. Cavusoglu e Sulusoglu (2013) testaram vários meios de cultura partindo de exemplos de outras solanáceas, tendo desenvolvido um protocolo eficiente para a micropropagação em larga escala desta espécie. Nos anos 80 e 90 do séc. XX tinham sido já publicados estudos acerca de várias vertentes da biotecnologia vegetal desta espécie (Pierik, 1997), como a germinação

de sementes, cultura de meristemas, nódulos e ramificação axilar, regeneração adventícia de rebentos, regeneração de raízes e aclimatação, indução de calo (e sua regeneração), variação somaclonal, cultura de protoplastos, hibridização somática e transformação genética (Tabela 4).

Apesar deste conjunto de abordagens, ainda se conhece pouco sobre o comportamento *in vitro* da pera-melão, mais particularmente acerca do processo de indução de ES nesta espécie. Atkinson e Gardner (1991), através de calo secundário obtido a partir do seu protocolo de regeneração por organogénese, obtiveram plantas derivadas de ES. No entanto, a taxa de regeneração foi extremamente baixa (aproximadamente 5%). Apesar deste passo, ainda não existe nenhum protocolo estabelecido nem ocorreram mais tentativas de indução de ES na pera-melão.

c) **Tamarilho**

A propagação de tamarilho pode ser feita através de sementes, estacas (Prohens e Nuez, 2001), ou enxertia em *Solanum mauritianum* (Correia e Canhoto, 2012). Apesar da estacaria e enxertia serem métodos de propagação comuns, existe a necessidade de obter melhor material vegetal (Obando e Jordan, 2001). A diminuta taxa de polinização cruzada e a grande ocorrência 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.

Estudos prévios demonstraram uma boa resposta do tamarilho ao cultivo *in vitro*, tendo sido publicados vários trabalhos relativos à sua micropropagação (Tabela 5; Fig. 6). A aplicação da ES nesta espécie (Guimarães *et al.*, 1988, 1996; Lopes *et al.*, 2000; Canhoto *et al.*, 2005; Correia *et al.*, 2009, 2011) tem revelado particular interesse, não só para a clonagem de plantas e transformação genética, mas também para compreender melhor os mecanismos moleculares e citológicos envolvidos na formação e desenvolvimento do embrião (Correia *et al.*, 2011).

A indução de ES é possível a partir de vários explantes, incluindo embriões zigóticos maduros, folhas jovens, cotilédones e hipocótilos (Tabela 5, Correia e Canhoto, 2012). A recalcitrância de explantes originários de material adulto na indução de ES é frequentemente referida na literatura, particularmente em árvores (Thorpe e Stasolla, 2001) e algumas solanáceas (Seguí-Simarro *et al.*, 2011), limitando a clonagem de plantas

INTRODUÇÃO

de interesse. Uma forma alternativa de clonar tamarilho adulto via ES passa pelo estabelecimento *in vitro* de plantas, através da proliferação de meristemas axilares, seguido da indução de embriogênese em segmentos foliares provenientes das plantas estabelecidas (Correia *et al.*, 2011).

A indução de ES nesta espécie é obtida com um meio de cultura rico em auxinas, no qual a inclusão de elevados níveis de sacarose (9%) aumenta consideravelmente a eficiência do procedimento (85%), possibilitando um maior número de embriões somáticos (Guimarães *et al.*, 1996). Embriões com anomalias morfológicas tais como cotilédones fundidos, número alterado de cotilédones e germinação precoce são bastante comuns, sobretudo quando são utilizados baixos níveis de sacarose (Canhoto *et al.*, 2005).

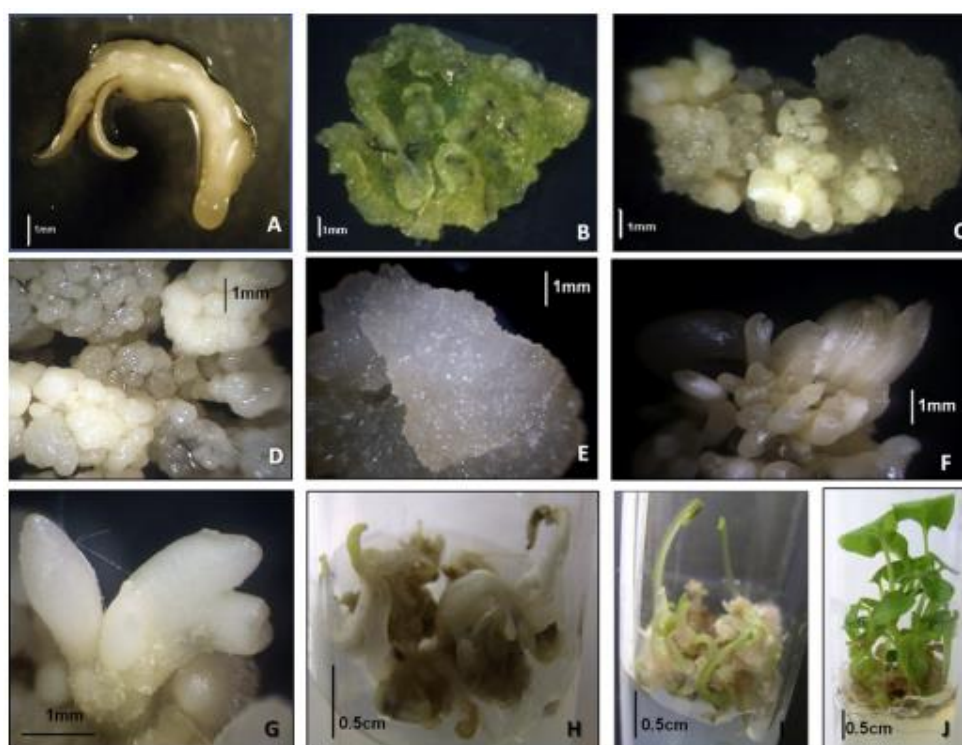


Figura 6. Embriogênese somática em tamarilho. (A) Embrião zigótico após duas semanas em cultura em meio com 2,4-D; (B) explante foliar após um mês de indução em meio MS suplementado com picloram; (C) áreas embriogênicas e não-embriogênicas (mais escuras) formadas a partir de um explante foliar após 10 a 12 semanas em cultura; (D) tecido embriogênico; (E) tecido não embriogênico; (F-G) embriões somáticos em diferentes estados de desenvolvimento depois de 3 semanas em meio MS sem auxinas. Notar em (G) a morfologia anômala dos embriões, mostrando a fusão dos cotilédones. (H-J) conversão de embriões somáticos e desenvolvimento de plântulas após 6 semanas em meio MS (Correia e Canhoto, 2012).

Os embriões zigóticos foram os primeiros explantes a ser testados na indução de ES, revelando a existência de duas vias de formação dos embriões somáticos, dependendo da auxina utilizada (NAA, picloram ou 2,4-D). O calo induzido na presença de NAA é incapaz de manter o seu potencial embriogénico e rapidamente perde a capacidade de diferenciação de embriões somáticos. Nestas condições, os embriões somáticos são capazes de prosseguir o seu desenvolvimento no meio de cultura inicial. A este processo de indução de ES é dada a designação *one-step*. Contrariamente ao que se observa em culturas com NAA, na presença das auxinas 2,4-D ou picloram, a divisão celular dá origem a um tecido embriogénico passível de manutenção em cultura. Subculturas deste calo em meio desprovido de auxinas, ou contendo 0,1 mg/l de ácido giberélico (GA₃), proporciona a diferenciação das massas embriogénicas em embriões somáticos. A este tipo de ES, em que dois meios de cultura distintos são necessários para alcançar a diferenciação total dos embriões somáticos, foi denominado *two-step* (Lopes *et al.*, 2000).

A formação e manutenção do tecido embriogénico oferece potencial para produção em massa e transformação genética. O calo embriogénico pode ser mantido em meio com auxina durante longos períodos de tempo sem perder o seu potencial embriogénico. No entanto, já foi demonstrada a sua instabilidade, principalmente quando mantido por períodos superiores a um ano (Canhoto *et al.*, 2005).

1.3. A importância dos sistemas modelo na compreensão da morfogénese vegetal

Para além de importantes ferramentas para a seleção de características agronómicas interessantes, os sistemas de cultura *in vitro* são também muito úteis como modelos de estudo em fisiologia e desenvolvimento de plantas. O estabelecimento de sistemas de regeneração *in vitro* eficientes é também o primeiro passo para o desenvolvimento de protocolos de transformação genética, de forma a introduzir novas características ou para estudar a regulação da expressão genética nas plantas (Magioli e Mansur, 2005).

Tabela 3. Embriogênese somática na beringela (adaptado de Kantharajah e Golegaonkar (2004), Sidhu *et al.* (2014)).

Espécie	Explante	Meio base	Regulador de crescimento	Referência
<i>S. melongena</i>	Hipocótilo	MS	4-20 mg/l NAA	Matsuoka (1983)
<i>S. melongena</i>	Folha	MS	10 mg/l NAA	Gleddie <i>et al.</i> (1983)
<i>S. melongena</i>	Protoplastos isolados a partir de folhas jovens	MS	2,4-D	Gleddie (1986)
<i>S. melongena</i>	Protoplastos isolados a partir de folhas jovens	Kao ou Nagata & Takebe	2,4-D	Gleddie <i>et al.</i> (1986)
<i>S. melongena</i> cv. Dourga	Folha	MS	10 mg/l NAA	Rotino <i>et al.</i> (1987)
<i>S. melongena</i> cv. Imperial Black Beauty	Cotilédones	MS	1,0-5,0 mg/l NAA	Fobert e Webb (1988)
<i>S. melongena</i> , <i>S. melongena</i> var. insanum, F ₁ de <i>S. melongena</i> x <i>S. melongena</i> var. insanum	Hipocótilo	MS	0,5-2,0 mg/l 2,4-D	Ali <i>et al.</i> (1991)
F ₁ de <i>S. melongena</i> cv. Suphal	Folha	MS	8,0 mg/l NAA + 0,1 mg/l KIN	Rao e Singh (1991)
<i>S. melongena</i> cv. Julietta	Plântula	MS	10 mg/l NAA	Mariani (1992)
<i>S. melongena</i> cv. Nagate shinkuro	Cotilédones	MS	50 µM 2,4-D	Saito e Nishimura (1994)
<i>S. melongena</i> cvs. Pusa Purple Long, White Cluster, Pusa Kranti, Pusa Purple Cluster	Hipocótilo, cotilédones, folha	MS	5,7-53,7 µM NAA	Sharma e Rajam (1995a)
<i>S. melongena</i> cv. Pusa Purple Long	Folha	MS	10,73 mM NAA + 0,5 mM putrescina	Yadav e Rajam (1997)

Abreviaturas: 2,4-D, ácido 2,4-diclorofenoxiacético; KIN, cinetina; MS, meio de Murashige e Skoog (1962); NAA, ácido 1-naftalenoacético

Tabela 4. Cultura *in vitro* e micropropagação da pera-melão (adaptado de Pierik, 1997).

Sistemas <i>in vitro</i> aplicados	Referência
Cultura de plântulas (germinação)	Atkinson e Gardner (1991); Pauli (1988); Cornejo <i>et al.</i> (1990)
Cultura de meristemas	Naser (1984)
Cultura de rebentos	Naser (1984); Joo <i>et al.</i> (1986); Pierik <i>et al.</i> (1993)
Cultura de nós e ramificação axilar	Joo <i>et al.</i> (1986); Pauli (1988); Atkinson e Gardner (1991); Pierik <i>et al.</i> (1993)
Regeneração adventícia de rebentos	Joo <i>et al.</i> (1986); Jordan <i>et al.</i> (1990a,b, 1993)
Indução, cultura e regeneração de calo	Atkinson e Gardner (1991); Joo <i>et al.</i> (1986); Sakamoto e Taguchi (1991)
Variação somaclonal	Atkinson e Gardner (1991)
Enraizamento e aclimação	Pauli (1988); Cornejo <i>et al.</i> (1990); Jordan <i>et al.</i> (1990a,b, 1993); Atkinson e Gardner (1991); Sakamoto e Taguchi (1991); Pierik <i>et al.</i> (1993)
Cultura de protoplastos, hibridização somática	Sakamoto e Taguchi (1991, 1994)
Transformação genética e regeneração por organogênese	Atkinson e Gardner (1991)

Tabela 5. Resumo das metodologias utilizadas na organogênese e embriogênese somática do tamarilho (adaptado de Correia e Canhoto, 2012).

Metodologia	Explante	Meio base	Reguladores de crescimento (μM)	Referência
Proliferação de meristemas axilares e organogênese	Segmentos nodais e botões florais de plantas de tamarilho adultas; folhas de rebentos <i>in vitro</i>	MS	BA (0,4-18) + KIN (1-18) + NAA (1,3-21)	Cohen e Elliot (1979)
Cultura de anteras	Anteras	MS	BA (0,4 ou 4) com ou sem NAA (1,6) ou IBA (1,4)	Cohen e Elliot (1979)
Embriogênese somática	Calo embriogênico	MS (líquido)	NAA, KIN, GA ₃ , ABA (0,01-10)	Guimarães <i>et al.</i> (1988)
Organogênese	Protoplastos obtidos a partir do mesófilo	V-KW	BA (2.5) + NAA (5) + 2,4-D (2.3); BA (2.5) + leite de coco	Obando <i>et al.</i> (1992)
Organogênese	Protoplastos obtidos a partir do mesófilo; discos foliares e segmentos de pecíolo; extremidade dos rebentos e segmentos nodais	1/2 V-KW (1% sacarose) MS (1% sacarose) MS sais + B5 vitaminas	NAA (2.5) + Zt (2.3); BA (4), IBA (0.5), NAA (0.25 ou 2.5) + BA (4 ou 12); IBA (5)	Atkinson e Gardner (1993); Obando <i>et al.</i> (1992); Guimarães <i>et al.</i> (1996)
Embriogênese somática e organogênese	Embriões zigóticos; Hipocótilo; cotilédones; segmentos radiculares	MS MS MS (1% sacarose)	NAA (0.5–27); BA (4–40); NAA, 2,4-D, BA (0.04–40); IBA (0.5)	Guimarães <i>et al.</i> (1996)
Embriogênese somática	Embriões zigóticos, segmentos de medula e tecidos florais de árvores adultas; folhas de plantas rejuvenescidas <i>in vitro</i>	MS	2,4-D (9) ou Pic (20) ou NAA (26) só ou combinado com KIN (23), Zt (9) ou TDZ (9)	Correia <i>et al.</i> (2009); Correia <i>et al.</i> (2011)
Embriogênese somática	Calo embriogênico	MS (4% sacarose)	ABA (0 or 8)	Correia <i>et al.</i> (2012)

Abreviaturas: ABA, ácido abscísico; BA, benziladenina; B5, meio de Gamborg *et al.* (1968); 2,4-D, ácido 2,4-diclorofenoxiacético; GA₃, ácido giberélico; IBA, ácido indol-3-butírico; KIN, cinetina; MS, meio de Murashige e Skoog (1962); NAA, ácido 1-naftalenoacético; Pic, picloram; TDZ, 1-phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)-ureia; V-KM, meio de Binding e Nehls (1978); Zt, zeatina.

A disponibilidade de sistemas modelo de ES permitiu analisar a embriogénese nas plantas de uma maneira mais eficaz. Estes modelos têm sido utilizados no estudo de processos de diferenciação celular vegetal e para aumentar o nosso entendimento sobre os aspetos funcionais dos genes implicados na ES (Correia, 2011).

O desenvolvimento de embriões somáticos assemelha-se, tanto morfológica como fisiologicamente, ao desenvolvimento de embriões zigóticos. Assim, a ES tem sido utilizada como um sistema experimental para investigar acontecimentos morfológicos, bioquímicos e fisiológicos da embriogénese (Zimmerman, 1993). Espécies que facilmente formam embriões somáticos como *Arabidopsis thaliana*, cenoura, abeto branco e alfalfa, têm sido utilizados para identificar e caracterizar moléculas sinal importantes no controlo do desenvolvimento embrionário (Correia, 2011).

A *Arabidopsis thaliana* tem sido exaustivamente utilizada como espécie modelo no estudo genético e molecular de vários sistemas vegetais, incluindo a embriogénese. Para além da existência de um protocolo bem definido de indução de ES, esta espécie oferece um vasto leque de informação disponível para todos os investigadores. Desde a sequenciação do seu genoma, em 2000 (Arabidopsis Genome Initiative, 2000), surgiu uma imensa variedade de novos recursos genómicos (Correia, 2011), e o desafio seguinte tornou-se a determinação em larga escala da função dos genes. Dos 26.000 genes identificados, menos de 10% tinham, em 2010, a sua função biológica definida experimentalmente (Chawla, 2010). Sendo esta herbácea um organismo modelo na agricultura biotecnológica, apresenta a oportunidade de fornecer informações importantes sobre o modo como a função dos genes pode também afetar a produção agrícola (Boyes *et al.*, 2001).

Arabidopsis foi originalmente adotada como organismo modelo devido à sua utilidade em ensaios de genética. As suas características importantes incluíam um curto ciclo de vida, pequenas dimensões e a elevada produção de sementes através de autopolinização. Apesar destas características ainda serem importantes, outros atributos que ainda não conseguiam ser previstos há 40 anos atrás permitiram que *Arabidopsis* continuasse a ser o modelo principal da biologia vegetal (Koornneef e Meinke, 2010).

Não há dúvida que os organismos modelo têm diversas vantagens e que sem eles o nosso conhecimento acerca dos mecanismos subjacentes a vários processos do desenvolvimento e fisiologia vegetais estariam ainda limitados. No entanto, as descobertas fundamentadas em organismos modelo como a *Arabidopsis* deverão ser testadas noutros organismos ou sistemas para verificar a sua efetividade.

A disponibilidade de protocolos eficientes de ES, organogénese e transformação genética da beringela, também podem oferecer excelentes sistemas modelo de investigação na fisiologia vegetal *in vitro*. Vários estudos publicados nos últimos anos apresentam exemplos do uso da beringela como espécie modelo. Refere-se por exemplo o estudo da expressão e incorporação do gene luciferase (*luc*) por Hanyu e a sua equipa, em 1999, e a demonstração do envolvimento da acumulação da BiP (*Binding Protein*) com o stresse nas plantas por Picoli e colaboradores, em 2001. Os tecidos da beringela também auxiliaram no esclarecimento do papel das poliaminas na morfogénese *in vitro* durante a organogénese (Scoccianti *et al.*, 2000) e a ES (Fobert e Webb, 1988; Sharma e Rajam, 1995a; 1995b; Yadav e Rajam, 1997; 1998).

Os sistemas de indução de ES na beringela são bons modelos para estudar as fases iniciais do desenvolvimento embrionário, tendo por exemplo sido identificadas classes de genes expressos em fases iniciais deste processo devido à sua utilização (Magioli e Mansur, 2005).

Para além da beringela, outra solanácea previamente mencionada tem demonstrado um papel emergente no entendimento de vários processos morfológicos *in vitro*. A indução de ES no tamarilho é um importante sistema que apresenta novas abordagens para perceber melhor os aspetos particulares da formação de embriões somáticos. A maior vantagem deste sistema é o facto de serem obtidos calo embriogénico e não embriogénico a partir do mesmo explante e dentro das mesmas condições de cultura. Partindo desta particularidade, poderão ser realizados estudos moleculares e bioquímicos que comparem estes dois tipos distintos de tecidos, em diferentes condições, com o objetivo de tentar identificar marcadores moleculares relacionados com o processo embriogénico (Correia e Canhoto, 2012). Durante os ensaios de indução de ES em diferentes explantes do tamarilho (Lopes *et al.*, 2000) foram comparados os perfis proteicos de calos embriogénicos e não embriogénicos, com o objetivo de identificar marcadores proteicos associados aos dois tipos de calo (Ferreira *et al.*, 1998). A identificação de uma proteína de 26,5 kDa (NEP-TC, *Non-Embryogenic Protein from Tamarillo Callus*, GenBank JQ766254, Fig. 7) no calo não embriogénico proveniente de vários explantes, tais como embriões zigóticos e hipocótilos isolados, cultivados nas mesmas condições, sugeriu que esta proteína pudesse ser considerada um regulador negativo da ES em tamarilho (Correia, 2011). A sequência de 222 aminoácidos da proteína, inferida a partir do seu cDNA (Faro *et al.*, 2003), revela elevada homologia com a família de proteínas tRNA/rRNA metiltransferase (SpoU) de *Arabidopsis* (Correia,

2011). Em *Arabidopsis*, esta família de proteínas inclui pelo menos cinco proteínas diferentes (Tabela 6), entre as quais a homóloga da NEP-TC, e que partilham um domínio conservado, encontrado nas SpoU metiltransferases (Correia, 2011). Estudos com mutantes e análises de expressão feitas até ao momento indicam o possível envolvimento desta proteína num mecanismo pós-translacional de controlo do processo de indução de ES (Correia e Canhoto, 2009; Correia, 2011).



Figura 7. Estrutura 3D da proteína NEP-TC (adaptado de Correia, 2011).

Tabela 6. Alguns membros da família de proteínas tRNA/rRNA metiltransferase (SpoU) da *Arabidopsis*. Os dados acerca da expressão durante o desenvolvimento indicados correspondem aos destaques assinalados no eFP Browser, mostrando os níveis de expressão para cada uma das proteínas.

Gene	Proteína	Expressão durante o desenvolvimento
AT4G17610	SpoU 20KDa	Ápice (inflorescência e níveis de transição); Semente embebida por 24 horas.
AT4G15520	SpoU 24KDa (ortóloga NEP-TC)	Ápice (inflorescência e níveis de transição); Semente embebida por 24 horas.
AT5G15390	SpoU 38.8KDa	Roseta (estado vegetativo).
AT5G26880	SpoU 41KDa / AGAMOUS-like	Semente seca.

Pelos diversos aspetos apontados, a beringela e o tamarilho dispõem de sistemas únicos, que permitem o estudo da morfogénese, tendo em conta que a regeneração *in vitro* pode ser induzida a partir de diferentes explantes, por diferentes reguladores de crescimento e vias morfogénicas. Para além disto, a disponibilidade de protocolos de transformação eficientes favorece estudos de regulação genética, especialmente aqueles relacionados com ES. Apesar de ser quase inevitável recorrer ao antigo organismo modelo

Arabidopsis, cujo desenvolvimento científico nos últimos 30 anos tem sido notável e recompensador (Koornneef e Meinke, 2010), estas solanáceas apresentam a vantagem adicional de o genoma do seu relativo próximo, o tomateiro, estar já sequenciado. Os procedimentos de indução de ES em *Arabidopsis* envolvem procedimentos difíceis e morosos, visto serem baseados na utilização de embriões zigóticos imaturos (Magioli e Mansur, 2005), o que não acontece na beringela e no tamarilho dada a vasta gama de explantes possíveis. Para além disto, para o caso específico do tamarilho, torna-se importante explorar novos modelos que possam contribuir para melhores resultados com outras espécies lenhosas de interesse (Correia e Canhoto, 2012). Desta perspetiva, estas plantas da família das solanáceas podem ser vistas como plantas modelo alternativas para estudar diferentes aspetos da biologia vegetal.

1.4. Objetivos e contextualização

Nos últimos anos, a embriogénese somática tem sido estudada no laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Ecologia Funcional da Universidade de Coimbra com o objetivo de melhor compreender os mecanismos moleculares, citológicos e fisiológicos envolvidos na indução e desenvolvimento dos embriões somáticos. De entre as espécies estudadas, o tamarilho tem-se revelado um sistema modelo particularmente interessante pelas razões referidas em secções anteriores. No entanto, os conhecimentos já adquiridos no tamarilho necessitam de ser testados noutras espécies para que os resultados obtidos possam ter um interesse e aplicações mais globais. Com base neste raciocínio, decidiu-se alargar os estudos de embriogénese e estabelecer protocolos semelhantes aos do tamarilho noutras duas espécies de solanáceas: a beringela e a peramelão. A escolha destas espécies resultou do facto de a beringela ser uma espécie não lenhosa, em que os ciclos reprodutivos são bastante mais curtos que no tamarilho, permitindo assim, uma análise futura mais eficaz da hereditariedade de genes relacionados com o controlo da embriogénese. Para além disso, trata-se de uma espécie em que já existem conhecimentos bastante consistentes sobre diferentes processos de morfogénese *in vitro*. No caso da peramelão, que apresenta um hábito intermédio entre a beringela e o tamarilho, devido às suas características semi-arbustivas, pretendeu-se, nesta fase inicial, verificar se as condições de indução de embriogénese somática no

tamarilho poderiam ser reproduzidas nesta espécie também pertencente ao género *Solanum* e com potencial para ser explorada comercialmente.

Tendo em conta esta conjuntura, o trabalho concretizado teve como objetivos primordiais a abordagem de diferentes sistemas de indução de ES, em três espécies de solanáceas com interesse económico e/ou biotecnológico. Neste caso, o seu interesse biotecnológico centra-se na sua contribuição como sistemas modelo alternativos que auxiliem na compreensão de processos de morfogénese, como a ES, através da expressão de genes de interesse específicos, como o *NEP-TC*. Para o atingir destes objetivos procedeu-se à realização de inúmeros ensaios de indução de ES, nas três espécies em estudo, testando diversos reguladores de crescimento, variando as suas concentrações, numa tentativa de uniformizar os sistemas de indução. Analisaram-se os transcritos de *NEP-TC* em tecidos das diferentes solanáceas, antes e depois do processo de indução e, paralelamente, foi estudada a sua expressão no sistema de ES recorrendo ao sistema modelo tradicional *Arabidopsis*. Os procedimentos e os resultados obtidos encontram-se descritos nas secções seguintes.

2. MATERIAL E MÉTODOS



2.1. Comparação dos sistemas de indução de ES em beringela, pera-melão e tamarilho

2.1.1. Estabelecimento *in vitro* e material vegetal

No presente trabalho foram utilizados vários genótipos das três espécies de solanáceas em estudo, *Solanum melongena* (beringela, linha B), *Solanum muricatum* (pera-melão, linha PM) e *Cyphomandra betacea* (tamarilho, linha TDJ), estabelecidos *in vitro* através da germinação de sementes seguida de micropropagação, de acordo com as condições resumidas na Tabela 7.

As sementes utilizadas foram desinfectadas superficialmente durante 15 minutos numa solução de 7% (w/v) de hipoclorito de cálcio e 2 a 3 gotas de Tween 20, sob agitação, seguido de 3 lavagens com água esterilizada e 12-24 h de embebição. Após desinfecção, as sementes foram germinadas em caixas de Petri (9 cm diâmetro) com algodão e papel de filtro embebidos em água esterilizada e a zona apical das plântulas germinadas foi inoculada em tubos de ensaio (15 x 2,2 cm) contendo cerca de 15 ml de meio MS suplementado com 3% (w/v) de sacarose.







Após o estabelecimento *in vitro*, foi testada a capacidade de multiplicação das plantas das várias linhas B, PM e TDJ através da cultura sucessiva de ápices meristemáticos e segmentos nodais (1-1,5 cm) em tubos de ensaio contendo meio MS com 3% (w/v) de sacarose e suplementado com diferentes concentrações de benziladenina (BA), como indicado na Tabela 7. Foi também testada a capacidade de multiplicação dos explantes em caixas de cultura (Microbox 11 x 8 cm) contendo cerca de 100 ml do mesmo meio de cultura testado em tubos de ensaio. Todas as linhas estabelecidas foram subcultivadas a cada 3 - 4 semanas em meio de cultura fresco.

A todos os meios de cultura referidos foi adicionado 0,6% (w/v) de agar e o pH foi ajustado para 5,6-5,8 antes da autoclavagem a 121°C durante 20 min. Todas as culturas foram mantidas a 24±1°C sob um fotoperíodo de 16h luz (15-20 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) / 8h escuro.

Durante os ensaios foram-se eliminando gradualmente as linhas que apresentavam menor capacidade de multiplicação e desenvolvimento. Este processo foi feito através da contagem de nós por planta.

No caso das linhas de pera-melão, algumas plântulas enraizadas em meio de micropropagação foram transferidas para vasos contendo terra e turfa (2:1) e aclimatadas em câmara de cultura a 20°C com um fotoperíodo 16h luz (25-35 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) / 8h escuro.

Tabela 7. Condições testadas na micropropagação de ápices meristemáticos e segmentos nodais de beringela, pera-melão e tamarilho

Espécie	Origem das sementes	Recipiente	Meio de micropropagação (Meio base MS, 3% sacarose)	
			Reguladores de crescimento (mg/l)	
Beringela	Cultivar Black Beauty de <i>S. melongena</i> (Vilmorin)	Tubos de ensaio (15 x 2,2 cm) 	Sem reguladores de crescimento	
		Caixas de cultura (Microbox 11 x 8 cm) 	Sem reguladores de crescimento	
Pera-Melão	Frutos frescos	Tubos de ensaio (15 x 2,2 cm) 	BA (0.2)	
		Caixas de cultura (Microbox 11 x 8 cm) 	BA (1)	
Tamarilho	Frutos frescos	Tubos de ensaio (15 x 2,2 cm) 	Sem reguladores de crescimento	
		Caixas de cultura (Microbox 11 x 8 cm) 	BA (0.2)	

2.1.2. Indução de ES

Nos ensaios de indução de ES realizados (Fig. 8) procurou-se caracterizar e relacionar a resposta das três espécies de solanáceas em estudo, testando-se os meios de indução descritos na Tabela 8. A todos os meios de cultura, utilizados nos ensaios de indução de ES, foi adicionado 0,25% (w/v) de gelificante (Phytigel, Sigma) e o pH ajustado para 5,6-5,8 antes da autoclavagem a 121°C durante 20 min. Após os respetivos períodos de indução foi possível avaliar a capacidade embriogénica dos explantes das três espécies. As observações focaram-se em aspetos como a formação de embriões somáticos, a formação de calo e/ou raízes e explantes sem resposta. A análise estatística

(GraphPad Prism 5) foi feita através da análise de variância (ANOVA) e as diferenças significativas foram identificadas utilizando o teste de Tukey ($p = 0,05$).

Nas secções seguintes descreve-se detalhadamente o procedimento seguido para cada espécie.

Tabela 8. Composição dos meios de cultura testados na indução de ES a partir de explantes de beringela, tamarilho e pera-melão, linhas B, TDJ e PM, respetivamente.

Meio de indução de ES (Meio base MS)			Beringela	Tamarilho	Pera-melão	
Meio	Reguladores de crescimento (mg/l)	Sacarose (% w/v)	Linha policlonal B	Linha policlonal TDJ	Linha policlonal PM	
			Folhas	Folhas	Folhas	Pecíolos
TD1 ₉	2,4-D (1)	9	✓	✓	✓	✓
TD2 ₉	2,4-D (2)	9	✓	✓	✓	✓
TD4 ₉	2,4-D (4)	9	✓	✓	✓	✓
TN1 ₉	NAA (1)	9	✓	✓	✓	✓
TN2 ₉	NAA (2)	9	✓	✓	✓	✓
TN4 ₉	NAA (4)	9	✓	✓	✓	✓
TN4K ₉	NAA (4) + Kin (0,1)	9			✓	✓
TN8 ₉	NAA (8)	9		✓	✓	✓
TN10 ₉	NAA (10)	9		✓	✓	✓
TP4	Picloram (4)	9		✓		
TP5	Picloram (5)	9			✓	✓
TD1	2,4-D (1)	3	✓			
TD2	2,4-D (2)	3	✓			
TD4	2,4-D (4)	3	✓			
TD8	2,4-D (8)	3	✓			
TD10	2,4-D (10)	3	✓			
TN1	NAA (1)	3	✓			
TN2	NAA (2)	3	✓			
TN4	NAA (4)	3	✓			
TN4K	NAA (4) + Kin (0,1)	3	✓			
TN8	NAA (8)	3	✓			
TN10	NAA (10)	3	✓			

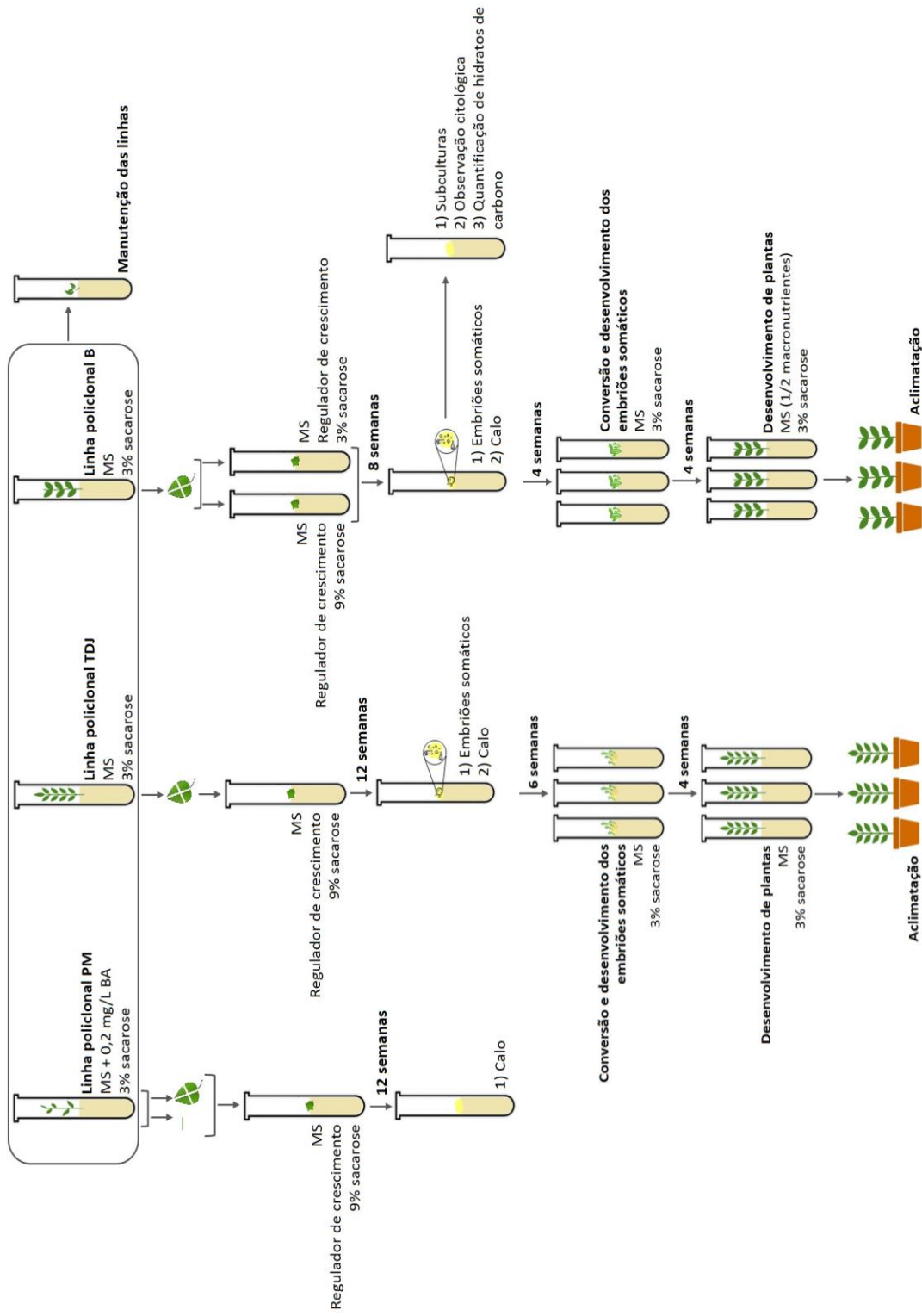


Figura 8. Representação esquemática do procedimento experimental seguido para a indução de ES em pera-melão, tamarilho e beringela.

(a) Indução de ES na beringela

Secções foliares (limbo) dos vários genótipos das linhas B foram submetidos às condições de indução apresentadas na Tabela 8. Para a indução de ES foram utilizadas secções foliares de plantas da linha policlonal B com cerca de 1 mês de crescimento e folhas com 1,5 - 3 cm de comprimento. Foi retirada a zona apical (cerca de 2 cm) de cada planta, a qual se inoculou em tubos de ensaio com meio de micropropagação (Tabela 7) para assegurar a manutenção das linhas em cultura. As folhas mais jovens foram destacadas e seccionadas em partes semelhantes, após remoção da nervura central. Cada tratamento incluiu 3 réplicas, de 10 explantes foliares cada, os quais foram feridos aleatoriamente e colocados com a página abaxial em contacto com o meio de cultura. As culturas mantiveram-se no escuro, a $24\pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 8 semanas. No final do ensaio foram mantidos 10 explantes, no mesmo meio de cultura, dos meios de indução TN1₉, TN2₉, TN4₉, TD1, TD2, TD4, TN1, TN2 e TN4 para testar a capacidade embriogénica e de proliferação após 14 semanas em cultura.

(b) Indução de ES em pera-melão

Explantes foliares (limbo) e pecíolos dos vários genótipos das linhas PM foram submetidos a diferentes condições de indução de ES semelhantes às descritas para a beringela (Kantharajah e Golegaonkar, 2004) e o tamarilho (Correia *et al.*, 2012), testando-se os reguladores de crescimento e explantes da linha policlonal PM referidos na Tabela 8. Para a indução de ES foram utilizadas secções foliares e pecíolos de plantas da linha PM com cerca de 2 meses de crescimento contendo folhas com 0,5-1 cm de comprimento. Foi retirada a zona apical (cerca de 2 cm) de cada planta multiplicada em tubos de ensaio com meio de micropropagação (Tabela 7) para assegurar a manutenção das linhas em cultura. O procedimento de indução com os explantes foliares foi efetuado tal como descrito na secção anterior, excetuando a remoção da nervura central dado o pequeno tamanho das folhas.

Os pecíolos com, aproximadamente, 0,5 cm foram seccionados e colocados diretamente no meio de indução de ES.

Nos ensaios em que foram testados os meios de cultura TN4K₉, TN8₉, TN10₉ e TP5 foram utilizadas 3 réplicas, de 5 explantes cada. Para os restantes meios de cultura

não foram efetuadas réplicas. A linha PM encontrava-se estabelecida *in vitro* há pouco tempo aquando do ensaio que por consequência não permitiu a obtenção da quantidade de material vegetal necessário. As culturas mantiveram-se no escuro, a $24\pm 1^\circ\text{C}$, durante 12 semanas.

(c) Indução de ES em tamarilho

O sistema de indução de ES no tamarilho é um sistema otimizado (Correia *et al.*, 2012), pelo que foi utilizado neste trabalho como base de comparação para os resultados obtidos em alguns dos ensaios efetuados, principalmente com a pera-melão. Foi também testada a similaridade que a resposta desta solanácea poderia ter com meios de indução, contendo as auxinas 2,4-D e NAA (Tabela 8), que apresentam os melhores resultados na beringela (Kantharajah e Golegaonkar, 2004).

Paralelamente foi testada a influência da presença, ou ausência, de BA no meio de micropropagação das plantas, na indução de ES nos explantes foliares de tamarilho. Este ensaio consistiu na indução, no mesmo meio de cultura TP4 (Tabela 8), partindo de explantes foliares provenientes de plantas micropropagadas em meio MS e MS suplementado com 0,2 mg/l BA (Tabela 7).

Para a indução de ES foram utilizadas secções foliares (limbo) de plantas das linhas TDJ com cerca de 2 meses de crescimento e com folhas com 1,5 cm de comprimento. Tal como descrito anteriormente, foi assegurada a manutenção das linhas em cultura em meio de micropropagação fresco (Tabela 7), através da cultura da zona apical. O processo de indução, utilizando os explantes foliares, e o número de réplicas e explantes foi efetuado tal como é descrito na secção 2.1.2. (a). As culturas mantiveram-se no escuro, a $24\pm 1^\circ\text{C}$, durante 12 semanas.

(d) Observação citológica e quantificação da acumulação de hidratos de carbono nas células induzidas

De forma a tentar compreender as diferenças do potencial morfogénico do calo obtido nas induções de ES, foram efetuadas observações citológicas para comparar a organização das células induzidas de beringela, pera-melão e tamarilho.

Para as observações citológicas, pequenas secções (1mm) de calo proveniente de ensaios com meio de indução com 3% e 9% de sacarose, no caso da beringela e meio TN10₉, no caso do tamarilho e da pera-melão, foram colocadas numa lâmina de microscópio e comprimidas (*squash*) em carmim acético. As preparações foram observadas no microscópio Nikon Eclipse E400 equipado com uma câmara digital Nikon (modelo Sight DS-U1) utilizando o *software* Act-2U.

Posteriormente, com o objetivo de perceber se diferentes quantidades de sacarose nos meios de indução de ES, testados para a beringela, afetariam a quantidade de amido nas células, e conseqüentemente a capacidade embriogénica do calo de beringela, amostras de calo dos meios TN1, TN2, TN4 e TN1₉, TN2₉, TN4₉ (Tabela 8) foram submetidas a uma análise quantitativa de hidratos de carbono. Após o período de indução foram recolhidas e rapidamente congeladas em azoto líquido, antes de serem preservadas a -80°C.

Para análise quantitativa dos hidratos de carbono de reserva, procedeu-se de acordo com o protocolo descrito por Hansen e Møller (1975). Resumidamente, cerca de 500 mg de calo proveniente dos diferentes meios de cultura, foi macerado em azoto líquido e transferido para um microtubo (1,5 ml) ao qual foi adicionado 1 ml de acetona, seguindo-se uma centrifugação durante 10 min a 4000 rpm (rotações por minuto), removeu-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspendido em 2,5 ml de etanol a 80% (v/v) e transferido para um novo tubo. Após nova centrifugação (10 min, 4000 rpm) procedeu-se à recolha e reserva do sobrenadante (açúcares solúveis). O *pellet* foi novamente ressuspendido em 2,5 ml de etanol a 80% (v/v), repetindo o passo descrito anteriormente. Após a centrifugação o novo *pellet* foi ressuspendido em 5 ml de HCL 1,1% (v/v). Esta solução permaneceu em banho-maria (100°C) durante 30 min seguido por uma nova centrifugação (10 min, 4000 rpm). O sobrenadante, contendo amido, foi recolhido e guardado para quantificação. As concentrações de açúcares solúveis e amido foram quantificadas utilizando uma solução de antrona a 0,2% (w/v) e H₂SO₄ a 72% (v/v), usando glucose como padrão. A absorvância foi lida a 630 nm.

2.1.3. Maturação, germinação e aclimação de embriões somáticos

(a) Beringela

Após o processo de indução de ES, explantes de calo (5 por meio de indução) foram transferidos para meio MS sem reguladores de crescimento para testar a sua capacidade embriogénica. Foram também transferidos explantes de embriões somáticos (5 por meio de indução) para tubos de ensaio contendo meio MS suplementado com 3% (w/s) sacarose (pH 5,6-5,8), sem reguladores de crescimento (Fig. 8). Após 4 semanas em cultura a $24\pm 1^\circ\text{C}$ sob um fotoperíodo de 16h luz ($15\text{-}20\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)/8h escuro, plântulas e rebentos, obtidos a partir do calo e dos embriões, foram contabilizados. Foram transferidos para meio MS, com metade dos macronutrientes, 15 plântulas e 15 rebentos para testar a viabilidade do seu desenvolvimento. Passadas 4 semanas em cultura foi registado o número de rebentos e plântulas sobreviventes que desenvolveram normalmente.

Plântulas enraizadas foram transferidas para vasos contendo terra e turfa (2:1) e colocadas na câmara de cultura a 20°C com um fotoperíodo 16h luz ($25\text{-}35\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)/8h escuro. Após 6 semanas de aclimação as plantas já se encontravam em crescimento numa estufa de exterior num substrato com turfa, areia e perlite (2:1:1) (Fig. 8).

(b) Tamarilho

Massas embriogénicas de dimensões semelhantes (1 por meio de indução), induzidas nos meios de cultura TN4₉, TD1₉ e TD2₉ (Tabela 8) foram transferidos para meio MS suplementado com 3% (w/v) de sacarose (pH 5.6-5.8) sem reguladores de crescimento (Fig. 8). Este ensaio serviu apenas para verificar a capacidade embriogénica das massas de células obtidas. As culturas foram mantidas a $24\pm 1^\circ\text{C}$ sob um fotoperíodo de 16h luz ($15\text{-}20\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)/8h escuro.

Algumas plântulas que demonstraram um desenvolvimento normal, foram transferidas para vasos contendo uma mistura de terra e turfa (2:1) e colocadas na câmara de cultura a 20°C com um fotoperíodo 16h luz ($25\text{-}35\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)/8h escuro (Fig. 8).

2.1.4. Análise da expressão da NEP-TC nos tecidos induzidos através de RT-PCR

A abundância dos transcritos da NEP-TC em tamarilho e dos seus homólogos em beringela e pera-melão foi determinada utilizando RNA extraído de amostras com 100mg, de folhas e calo com características embriogénicas e não embriogénicas da beringela e do tamarilho, e folhas e calo com características não embriogénicas da pera-melão. Depois da maceração das amostras em azoto líquido, o RNA foi isolado utilizando o kit NucleoSpin RNA Plant (Macherey-Nagel, Germany). A concentração do RNA foi determinada utilizando um espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies). A qualidade e integridade do RNA foi estimada através de uma eletroforese em gel de agarose 1% (w/v). As amostras foram preservadas a -80°C. Para o RT-PCR, a síntese do cDNA foi efetuada utilizando 1 µg de RNA tratado com DNase (RNase-Free DNase Set, Qiagen, Hilden, Germany) e 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) (Roche, Mannheim, Germany). A reação conteve 1x tampão de reação, 20 unidades de inibidor de RNase, 1mM de dNTP's, 5mM de DTT e 10 unidades de transcriptase reversa, num volume final de 20 µl.

Os cDNA's de cadeia simples resultantes foram amplificados através de PCR utilizando *primers* específicos. Os *primers* 5'-ACATAGCAAAGAGACACAACGTCGGAA-3' e 5'-TTGAGGAAGGTTTTAGCATCGGCAA-3' foram utilizados para amplificar um fragmento de 175 pb da sequência de cDNA do *NEP-TC*. O gene *ELONGATION FACTOR 1-α (EF1α)* (Nicot *et al.*, 2005) foi utilizado como controlo para o RT-PCR, com um fragmento de 380 pb amplificado pelos *primers* 5'-ACCCGTGAACATGCATTGCTTGCT-3' e 5'-ACACCAGTCTCAACACGACCAACA-3'. Nas reações de amplificação foram utilizados 1µl do cDNA sintetizado de cada uma das amostras, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 µM dNTP's, 0,2 µM de cada primer, 1x tampão GoTaq Polimerase e 1 unidade de GoTaq Polimerase (Promega), num volume final de 20 µl. O programa de PCR iniciou com uma primeira desnaturação a 94°C durante 4 min, seguida por 35 ciclos a 94°C, *annealing* e 72°C, todos com a duração de 45 segundos. A fase de alongamento foi levada a cabo a 72°C por 4 min. As temperaturas de *annealing* foram 54°C para os *primers* do *NEP-TC*, e 60°C para os *primers* do *EF1α*. A reação decorreu no termociclador MJ Mini Personal

Thermal Cycler (Bio-Rad) e os produtos PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% (w/v) corado com 4 µl/100 ml de Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics Europe). Foram carregados 3 µl de marcador de DNA (HyperLadder™ II, Bioline) juntamente com os produtos de PCR. A quantificação dos níveis de expressão relativos foi feita em relação ao controlo *EF1α*, utilizando o software Image J 1.48v.

2.2. Avaliação morfológica de linhas de *Arabidopsis thaliana knockout* para genes da família das SpoU metiltransferases de RNA

2.2.1. Material vegetal e condições de cultura

Para estudar a significância funcional da NEP-TC e de proteínas da família das metiltransferases de RNA no desenvolvimento e no processo de indução de ES, foram selecionadas linhas de *Arabidopsis* com inserções de T-DNA nos genes *AT5G15390* e *AT4G15520*, identificados como genes que codificam proteínas com função de Metiltransferases de rRNA/tRNA. As linhas SALK_149181 (MT5) e SALK_027418 (KO7), obtidas pelo *Salk Institute Genomic Analysis Laboratory* (signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress; Alonso *et al.*, 2003), utilizadas neste estudo, estão descritas como homozigóticas, com o T-DNA inserido num exão do gene *AT5G15390* e num intrão do gene *AT4G15520* (Fig. 9). As sementes de *Arabidopsis* (Col-0) e das linhas de inserção de T-DNA SALK, também do ecótipo Columbia (Col-0), foram providenciadas por *Nottingham Arabidopsis Stock Centre*.

As sementes foram superficialmente desinfetadas durante 15 min a 1000 rpm numa solução de etanol absoluto e lixívia (4:1) seguido de duas lavagens de etanol absoluto. Após a secagem, em condições estéreis, foram colocadas em meio MS a meia-força, suplementado com 1% (w/v) de sacarose e 0,8% (w/v) de fitoagar (Duchefa). Antes de serem colocadas nas condições de cultura apropriadas (estufa a 20°C com um fotoperíodo 16h luz (25-35 µmol m⁻²s⁻¹)/8h escuro) sofreram um período de vernalização a 4°C (2-3 dias). O posterior cultivo em solo decorreu nas mesmas condições de dias curtos num substrato composto por terra e turfa (2:1).

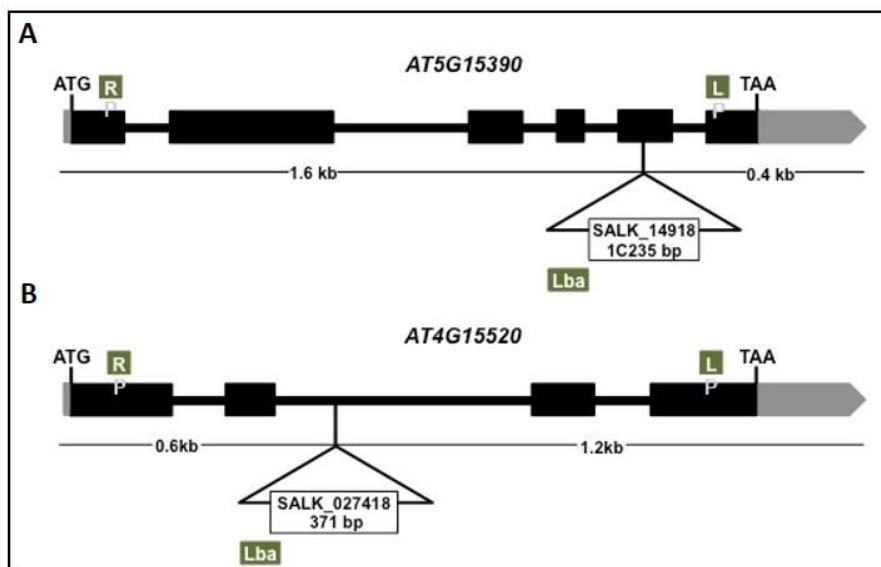


Figura 9. Representação esquemática da estrutura dos genes *AT5G15390* (A) e *AT4G15520* (B) e posicionamento da inserção de T-DNA nas respectivas linhas mutantes (Adaptado de Correia, 2011).

2.2.2. Seleção de plantas homozigóticas para a inserção do T-DNA

DNA proveniente de inflorescências de plantas com 4 semanas foi isolado e utilizado para identificar mutantes homozigóticos para a inserção de T-DNA através da técnica de PCR. A extração de DNA foi efetuada utilizando um método modificado baseado no descrito em Murray e Thompson (1980). Após a maceração do tecido vegetal em azoto líquido, foram adicionados 300 μ l do tampão 2x CTAB (2% (v/v) CTAB; 1,5 M NaCl; 100 mM Tris HCl a pH 6; 20 mM EDTA a pH 8; 1% (v/v) β -mercaptoetanol). O material foi incubado 20 min a 65°C. Depois de arrefecer adicionaram-se 300 μ l de clorofórmio seguido de 30 s a 13000 rpm na microcentrífuga para separar as fases. A camada superior (fase aquosa, aproximadamente 200 μ l) foi transferida para um novo tubo ao qual foram adicionados 300 μ l de isopropanol seguido de nova centrifugação (5 min a 12000 rpm). O sobrenadante foi posteriormente removido e o *pellet* lavado com 500 μ l de etanol a 70% (v/v) durante 1 min a 13000 rpm. O etanol foi removido cuidadosamente e o *pellet* deixado a secar (*air dry*) durante aproximadamente 1 hora. Por último foram adicionados 100 μ l do tampão TE (10 mM Tris HCl a pH 6; 1 mM EDTA a pH 8) para que o *pellet* se dissolvesse. A concentração, qualidade e integridade do DNA foi determinada utilizando um espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop Technologies).

Para a reação de PCR foram utilizados *primers* específicos para o gene. Para a linha designada KO7 foram utilizados SALK_027418LP (5'-TGACTTGACAAAAGCCCTCAC-3') e SALK_027418RP (5'-GGCAGAGACCAACAATCATTG-3'); para a linha MT5 utilizaram-se SALK_149181LP (5'-ATTTTAGGGCTTGCTTTCCAC-3') e SALK_149181RP (5'-ATGGCTGGACATTGAGTTTTG-3'); foi também usado nos PCR's de ambas as linhas um *primer* específico para a região esquerda do T-DNA, Lba1 (5'-TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG-3'), tal como descrito em Stepanova e Alonso (2003). Na reação de PCR foram utilizados cerca de 75 ng de DNA extraído de cada planta, 1,5 mM de MgCl₂, 0,3 dNTP's, 0,4 μM de cada primer, 1x tampão GoTaq Polimerase e 1 unidade de GoTaq Polimerase (Promega), num volume final de 25 μl. O programa de PCR iniciou com uma primeira desnaturação a 94°C durante 4 min, seguida por 30 ciclos a 94°C, *annealing* a 60°C e 72°C, todos com a duração de 45 seg. A fase de alongamento foi levada a cabo a 72°C por 4 min. A reação decorreu no termociclador MJ Mini Personal Thermal Cycler (Bio-Rad) e os produtos PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% (w/v) corado com 4 μl/100 ml de Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics Europe). Foram carregados 3 μl de marcador de DNA (HyperLadder™ II, Bioline) juntamente com os produtos de PCR.

2.2.3. Indução de ES

A indução de ES foi baseada nos procedimentos descritos por Ikeda-Iwai *et al.* (2002). Foram recolhidas siliques imaturas de *Arabidopsis* (Col-0) e dos mutantes homozigóticos para a inserção de T-DNA com 8 e 14 semanas. As siliques foram superficialmente esterilizadas numa solução de hipoclorito de cálcio a 5% (w/v), com Tween 20, durante 20 min sob agitação, seguido de 3 lavagens com água esterilizada. As siliques desinfetadas foram dissecadas, em condições estéreis, com agulhas finas utilizando uma lupa. As sementes imaturas, contendo embriões zigóticos em estado torpedo, foram inoculadas em meio de indução de ES consistindo de meio basal B5 (Gamborg *et al.*, 1968) suplementado com 2% (w/v) de sacarose e 0,1 mg/l de 2,4-D. O meio de cultura foi solidificado com 0,25% (w/v) de Phytigel em caixas de Petri com 6 cm diâmetro (10 sementes por caixa, 3 réplicas de 10 caixas por linha) (Fig. 10). As culturas foram incubadas a 24±1°C, sob um fotoperíodo de 16h luz (15-20 μmol m⁻²s-

¹)/8h escuro, durante 4 semanas. Após o período de indução os resultados foram observados e registados. As observações focaram-se em aspetos como a formação de calo, embriões germinados precocemente, explantes sem resposta e formação de embriões somáticos. A análise estatística (GraphPad Prism 5) foi feita através da análise de variância (ANOVA) e as diferenças significativas foram identificadas utilizando o teste de Tukey ($p = 0,05$).

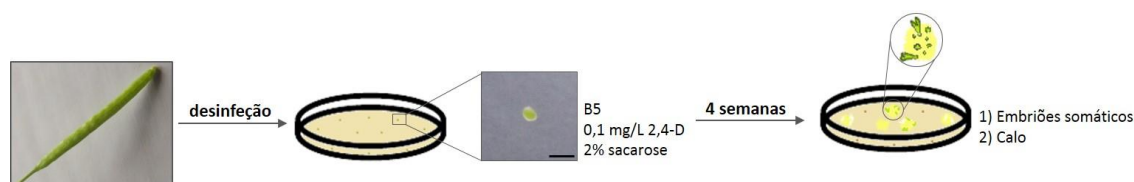


Figura 10. Representação esquemática do protocolo para a indução de ES em *Arabidopsis*. A barra corresponde a 1 mm.

2.2.4. Observação do desenvolvimento morfológico

Com o objetivo de tentar estabelecer uma associação entre a função dos genes *AT5G15390* e *AT4G15520* (homólogo do *NEP-TC*) e os fenótipos das plantas, foi realizado um ensaio de comparação do desenvolvimento de plantas *wild type* (WT) e dos mutantes *knockout* (KO). Para tal foi efetuada uma recolha de dados baseada nos procedimentos descritos por Boyes *et al.* (2001), que consistiu em duas fases diferentes. Numa primeira fase, foi reunido um conjunto de dados em intervalos de rotina no decorrer do desenvolvimento, de forma a refletir a taxa de crescimento e desenvolvimento da planta durante todo o seu ciclo de vida. A Figura 11 ilustra o subconjunto de alguns dos estádios de crescimento, utilizados como marcos fundamentais de desenvolvimento, determinados durante este processo. A segunda fase consistiu numa recolha de medidas periódica, transversal ao crescimento da planta, consoante os marcos de desenvolvimento são atingidos. Os dados recolhidos nesta fase refletem várias características morfológicas em múltiplos estádios de crescimento antes e depois da floração.



Figura 11. Estádios de crescimento de *Arabidopsis* (A-I). Estádio de crescimento (A) 0,5 (emergência da radícula); (B) 0,7 (emergência do hipocótilo e dos cotilédones); (C) 1,0 (cotilédones completamente abertos); (D) 1,02 (desenvolvimento foliar, 2 folhas de roseta); (E) 1,04 (desenvolvimento foliar, 4 folhas de roseta); (F-G) 5,10 (emergência da inflorescência, primeiros botões florais); (H) 6,00 (primeira flor aberta); (I) 7,00 (produção de siliquas). As indicações numéricas dos estádios de crescimento estão de acordo com o descrito em Boyes *et al.* (2001). As barras correspondem a 1 mm.

3. RESULTADOS



3.1. Estabelecimento *in vitro* de linhas policlonais de beringela, pera-melão e tamarilho

O estabelecimento *in vitro* das linhas das três espécies em estudo foi feito a partir da germinação de sementes, não se observando a ocorrência de contaminações durante esse processo. As percentagens de germinação obtidas foram elevadas, com 80%, 75% e 83.3% para beringela (B), pera-melão (PM) e tamarilho (TDJ), respetivamente. Após o estabelecimento, de acordo com as condições descritas na secção 2.1.1., foram utilizados ápices caulinares e segmentos nodais para a multiplicação de plântulas das linhas policlonais B, PM e TDJ. Todas as linhas responderam satisfatoriamente às condições testadas (Figs. 12 e 13), possibilitando a duplicação do número de plantas em 6 semanas.

No caso da linha PM, foi utilizado na manutenção dos genótipos MS complementado com 0,2 mg/l de BA em detrimento de MS complementado com 1 mg/l de BA. Nos dois meios de micropropagação testados foram desenvolvidos em média 2,16 nós por cada planta multiplicada (Tabela 9). Após o estabelecimento de um protocolo de micropropagação adequado, foi possível aclimatar plantas enraizadas com cerca de 5-8 cm de altura (Fig. 13).

Tabela 9. Número de genótipos iniciais e finais estabelecidos *in vitro*, respetivas condições de micropropagação e número médio de nós por planta.

Linha	Nº inicial de genótipos / linha	Nº final de genótipos / linha	Condições de micropropagação	Nº médio de nós / planta
B	16	11	MS (tubos de ensaio)	6,69
PM	18	9	MS+0,2 mg/l BA (Microbox)	2,16
TDJ	15	11	MS (tubos de ensaio)	6,4

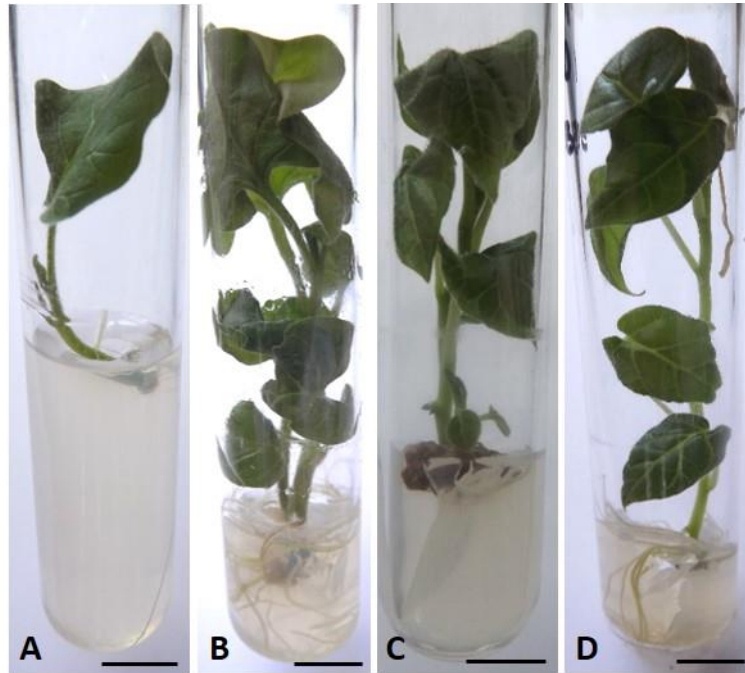


Figura 12. Diferentes estádios de desenvolvimento na clonagem *in vitro* de beringela (A-B) e tamarillo (C-D). (A) Rebentos caulinares de beringela após duas semanas e (B) quatro semanas em meio MS; (C) rebentos caulinares de tamarillo após 10 semanas em meio MS suplementado com 0,2 mg/l de BA e (D) em meio MS. As barras correspondem a 1 cm.

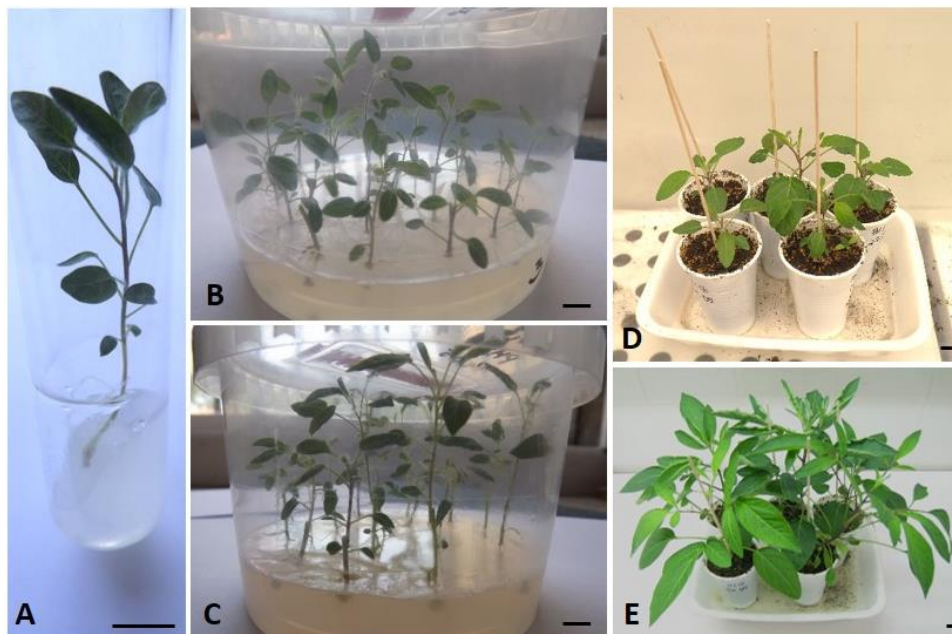


Figura 13. Diferentes estádios de desenvolvimento na clonagem *in vitro* de pera-melão (A-E). (A) Rebentos caulinares de pera-melão após 4 semanas em meio MS suplementado com 1 mg/l de BA; (B) Rebentos caulinares de pera-melão após 2 semanas e (C) 4 semanas em meio MS suplementado com 0,2 mg/l de BA em microbox; (D) aclimação de pera-melão após 2 semanas e (E) 4 semanas. As barras correspondem a 1 cm.

3.2. Indução de ES em explantes foliares de beringela, pera-melão e tamarilho

A inoculação de secções foliares (limbo) de plantas das linhas policlonais B, PM e TDJ, e pecíolos da linha PM conduziu a diferentes respostas nos meios de indução de ES testados (ver Figs. 14, 15, 19 e 21). Durante e após o período de indução, foram contabilizados e comparados os resultados obtidos para as diferentes condições, quanto às taxas de indução de calo, raízes, embriões somáticos e/ou calo embriogénico e ausência de resposta, e que serão descritos para cada uma das espécies em estudo, nas secções seguintes.

3.2.1. Indução de ES em beringela

Numa abordagem inicial, a resposta dos tecidos foliares de beringela foi avaliada tendo em conta as condições de indução de ES semelhantes às descritas para o tamarilho (Correia *et al.*, 2012) no que diz respeito à concentração de sacarose nos meios de indução (9%) e ao tempo de indução (12 semanas). Após 4 semanas em cultura, observou-se elevado desenvolvimento de calo na generalidade dos explantes, sobretudo para meios de indução com NAA, sendo estes os que também apresentavam o desenvolvimento de raízes (em mais de 70% dos explantes) e de embriões somáticos, em cerca de 20-25% dos explantes nos meios de cultura TN2₉ e TN4₉ (Fig. 16). A acentuada formação de calo (Figs. 14 e 16) levou à finalização do ensaio de indução após 6 semanas em cultura. Após este período, foram mantidos no mesmo meio de cultura 10 explantes provenientes de cada um dos meios de cultura TN1₉, TN2₉ e TN4₉, para que se pudesse testar a sua capacidade embriogénica e de proliferação. No entanto, após 14 semanas em cultura, não se observou calo viável, ocorrendo a oxidação das massas celulares e a formação de um número reduzido de embriões somáticos (Fig. 17).

As secções foliares induzidas em meios com 3% de sacarose apresentaram taxas elevadas de formação de calo em todos os meios de cultura testados (Fig. 16). No entanto, essa proliferação de calo foi ainda mais evidente na presença da auxina NAA, enquanto que na presença de 2,4-D ocorreu mais oxidação e menor formação de calo (Fig. 15). A formação de embriões somáticos foi observada apenas a partir da oitava semana em cultura (Fig. 16). As maiores taxas de indução de ES foram obtidas com a auxina NAA em meios de cultura suplementados com 3% de sacarose, com 60% e 63,3% de indução

RESULTADOS

para TN4 (4 mg/l de NAA) e TN8 (8 mg/l de NAA) respectivamente (Fig. 18). Para valores inferiores a 4 mg/l de NAA ou superiores a 8 mg/l as taxas de indução de embriões somáticos não ultrapassaram os 50%. Para os meios de cultura suplementados com 2,4-D, as taxas de indução foram significativamente mais baixas, registrando-se a taxa mais alta (cerca de 27%) para o meio com 1 mg/l (TD1), e uma redução para cerca de metade dos explantes induzidos (13%) quando a concentração da hormona aumentou para 2 mg/l. Em meios de cultura com concentrações superiores de 2,4-D não se observou a formação de embriões somáticos (Fig. 16). A adição de cinetina ao meio de cultura TN4 (TN4K) também não contribuiu para a formação de embriões, observando-se apenas a indução de calo e raízes (Figs. 15 e 16).

Tal como para o material induzido em meios com 9% de sacarose, foram também mantidos no mesmo meio de cultura 10 explantes provenientes de cada um dos meios de cultura TD1, TD2, TD4, TN1, TN2 e TN4. Para além da oxidação das massas de calo e da formação de alguns embriões em meios com a auxina 2,4-D, foi registado um desenvolvimento excessivo de calo na presença de NAA (Fig. 17).

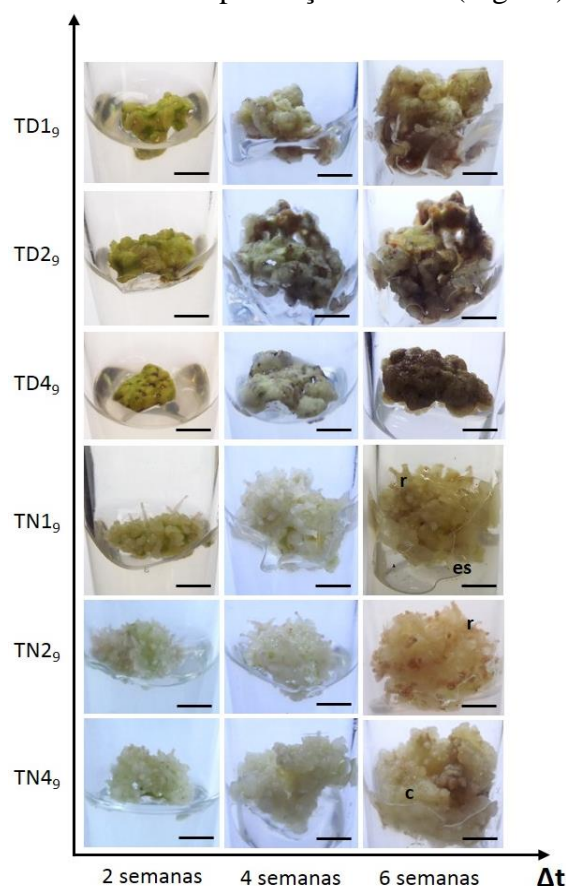


Figura 14. Explantes foliares de beringela ao longo do processo de indução de ES em meio base MS suplementado com 9% de sacarose e diversas combinações de reguladores de crescimento. **es** – embriões somáticos; **c** – calo; **r** – raízes. As barras correspondem a 0,5 cm.

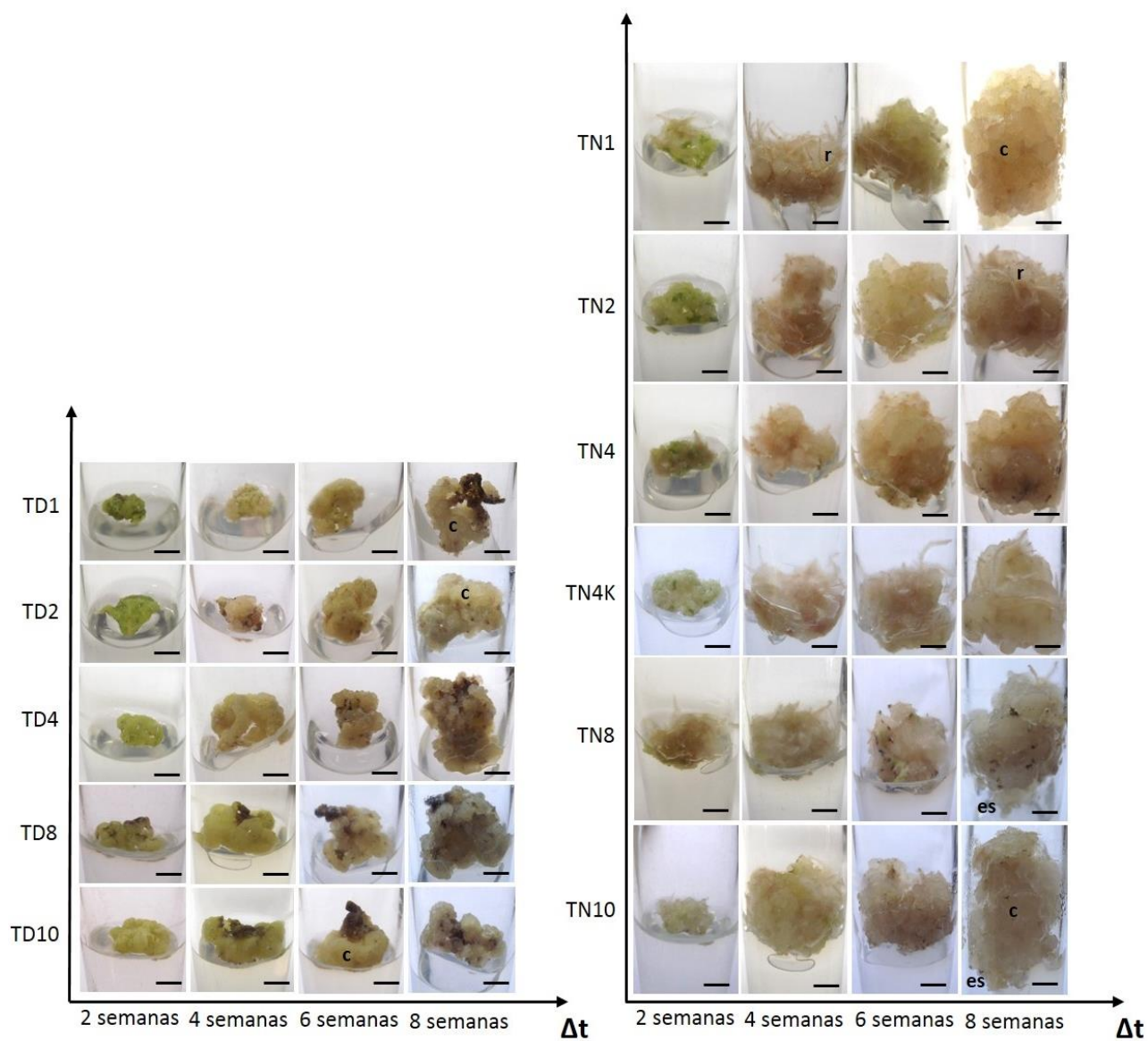


Figura 15. Explantes foliares de beringela ao longo do processo de indução de ES em meio base MS suplementado com 3% de sacarose e diversas combinações de reguladores de crescimento. *es* – embriões somáticos; *c* – calo; *r* – raízes. As barras correspondem a 0,5 cm.

RESULTADOS

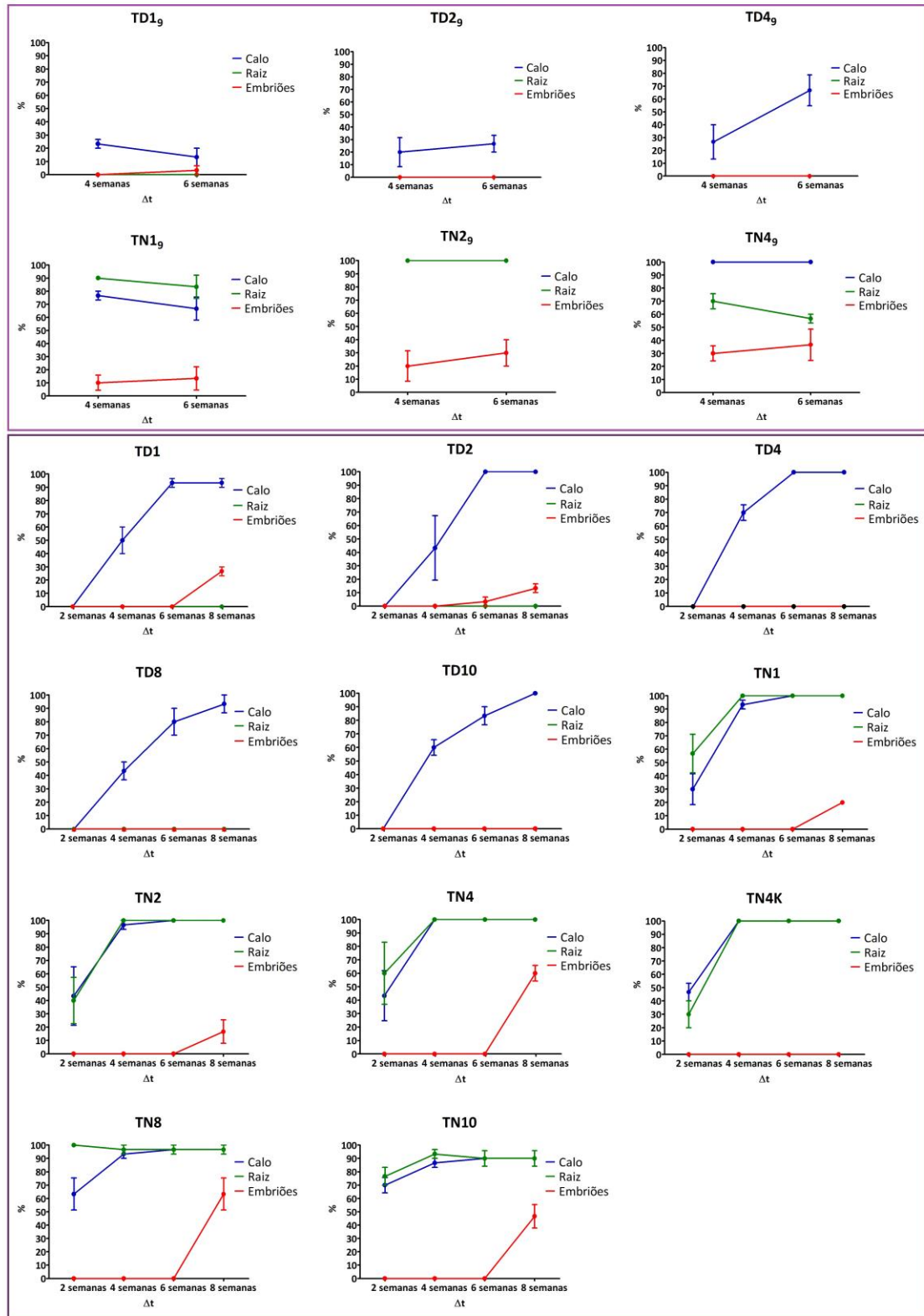


Figura 16. Taxas de indução de calo, raiz e embriões somáticos ao longo do processo de indução de ES na linha policlonal B em todos os meios de cultura testados. Os valores correspondem à média \pm erro padrão de 3 réplicas com 10 explantes cada.

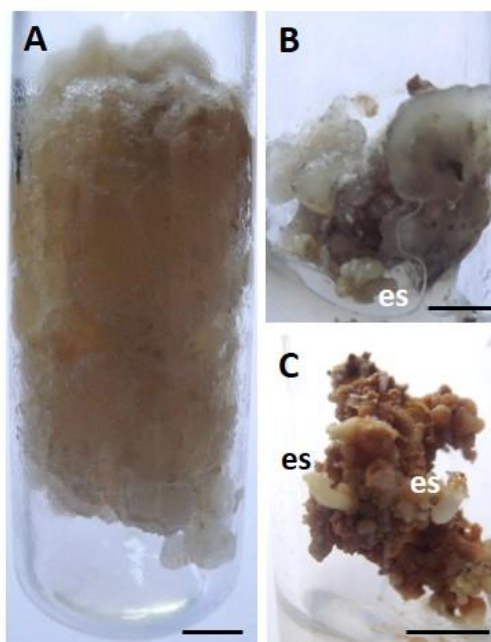


Figura 17. Explantes de beringela que permaneceram 14 semanas em meio de indução: **(A)** 1 mg/l NAA, 3% sacarose; **(B)** 2 mg/l 2,4-D, 3% sacarose **(C)** 2 mg/l NAA, 9% sacarose; **es** – embriões somáticos. As barras correspondem a 0,5 cm.

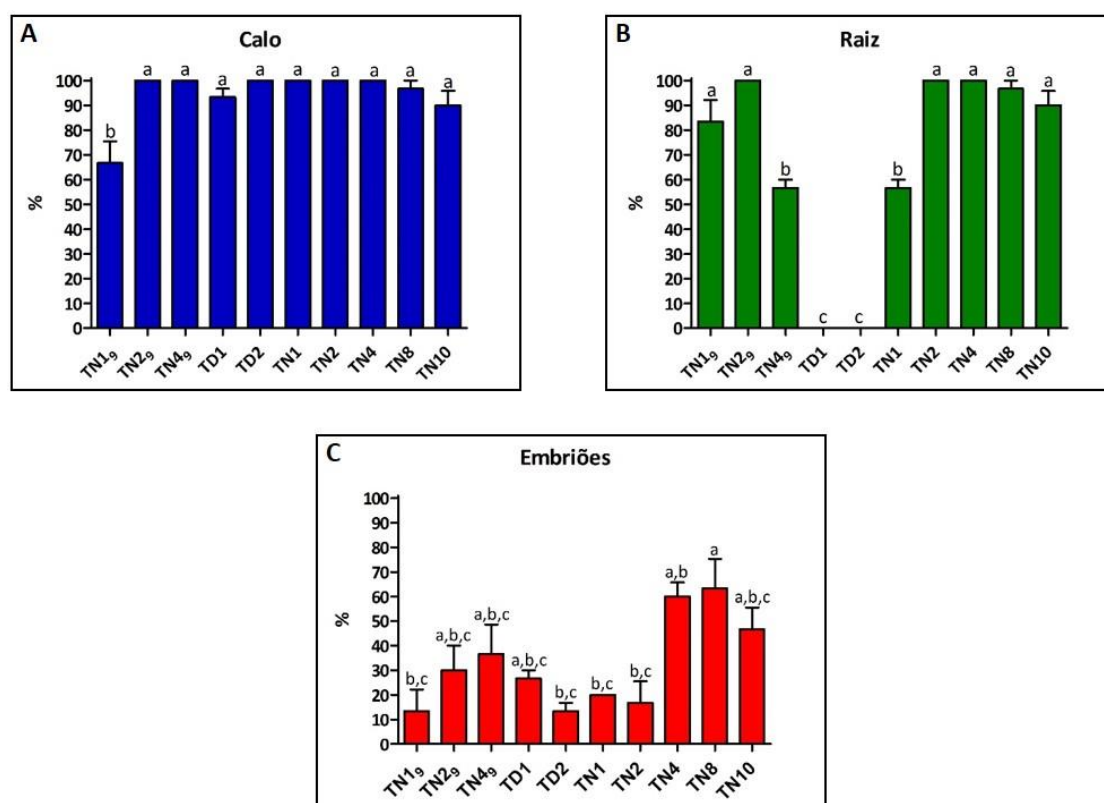


Figura 18. Taxas de indução de calo **(A)**, raiz **(B)** e embriões **(C)**, em explantes foliares de beringela, após 8 semanas, para os meios de cultura com maior percentagem de indução de ES. Os valores correspondem à média ± erro padrão de 3 réplicas com 10 explantes cada. Letras diferentes, para o mesmo tratamento, representam diferenças significativas segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.2.2. Indução de ES em pera-melão

A indução de ES em secções foliares e pecíolos da pera-melão resultou, ao fim de 12 semanas, na desdiferenciação dos explantes e formação de calo em todos os meios de cultura testados.

Ambos os explantes responderam de forma semelhante nos meios testados, com a exceção da formação de raízes, que ocorreu em secções foliares, na presença de maiores concentrações de hormona, e não se verificou em pecíolos (Figs. 19 e 20). Nos ensaios com a auxina NAA foi possível verificar que para maiores concentrações de hormona, menor a formação de raízes (Fig. 20). No caso do ensaio com o meio de cultura TN10₉, foi comum a formação de mais raízes em material com sinais de oxidação. Nos explantes em que o calo apresentava menor oxidação, a formação de raízes ocorreu em menor quantidade (Fig. 19A).

Na presença da auxina picloram, em poucos explantes ocorreu a formação de calo, revelando uma diferença significativa relativamente às restantes auxinas, onde ocorreu indução de calo em 100% dos explantes (Fig. 20). Para além deste aspeto, o calo formado não apresentou grande capacidade de proliferação, visto que passadas 12 semanas o tamanho das massas celulares se apresentava diminuto, comparativamente às desenvolvidas nos outros meios de cultura (Fig. 19).

Apesar das elevadas taxas de indução de calo, este material não apresentou capacidade embriogénica. Após 1 mês em cultura em meio MS sem reguladores de crescimento, as subculturas de calo não apresentavam sinais de diferenciação de embriões somáticos (dados não apresentados).

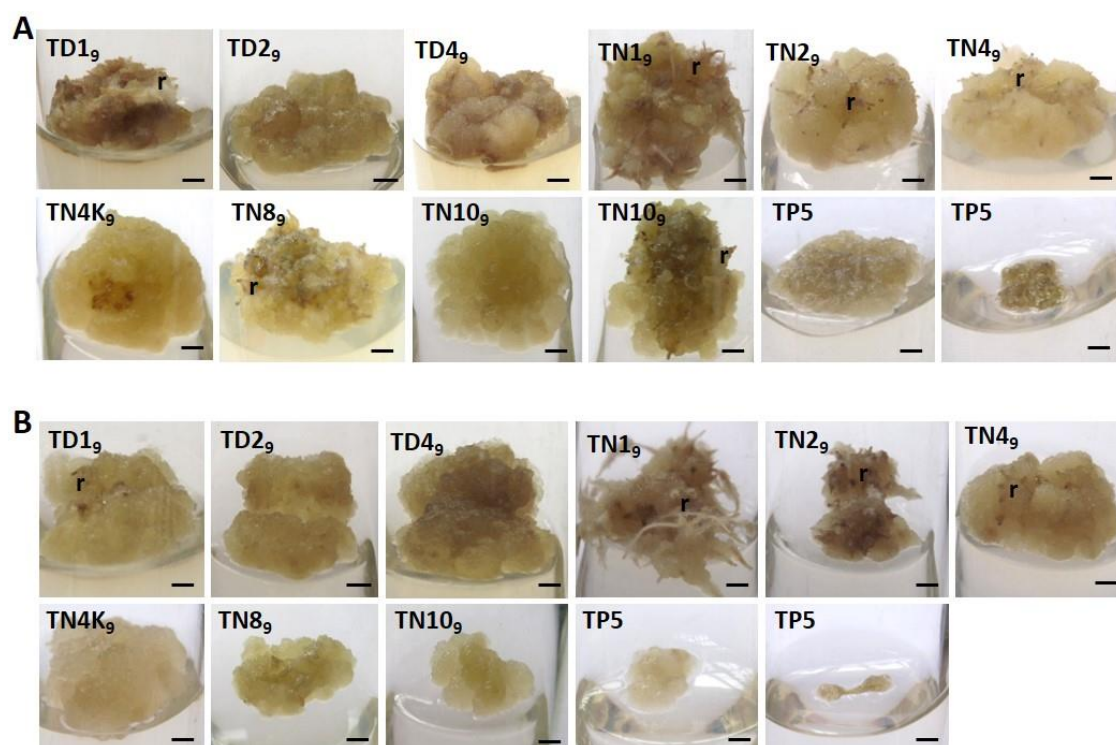


Figura 19. Explantes foliares (A) e pecíolos (B) de pera-melão após 12 semanas de indução de ES, com diferentes auxinas no meio de cultura. r – raízes. As barras correspondem a 2 mm.

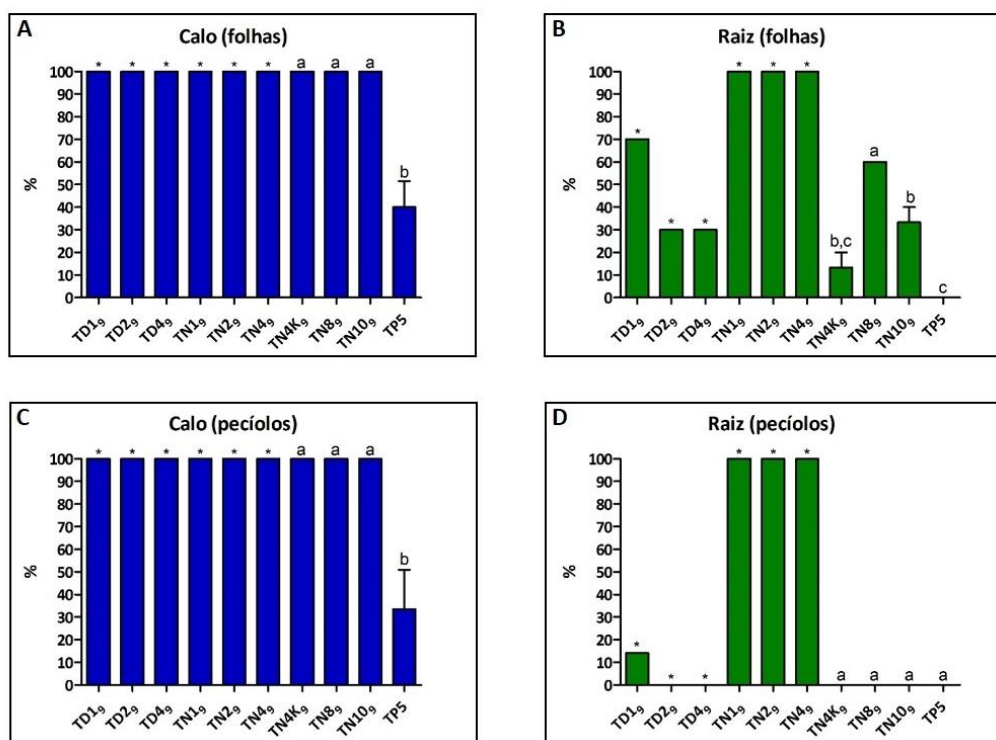


Figura 20. Taxas de indução de calo em folhas (A) e pecíolos (C), e de raízes em folhas (B) e pecíolos (D) resultantes da indução de ES em pera-melão. Os valores correspondem à média ± erro padrão de 3 réplicas com 5 explantes cada, com exceção dos tratamentos identificados com (*), os quais não foram replicados. Letras diferentes, para o mesmo tratamento, representam diferenças significativas segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.2.3. Indução de ES em tamarilho

A inoculação de explantes foliares da linha policlonal TDJ, em meio de indução de ES, durante 12 semanas, levou à formação 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. 21). No entanto, a formação dos diferentes tipos de calo referidos não ocorreu em todos os meios testados com as três auxinas diferentes (2,4-D, NAA e picloram) (Fig. 21). A maior taxa de indução de ES foi obtida com 4 mg/l da auxina picloram, observando-se a formação de calo embriogénico em 43,3% dos explantes, seguindo-se os valores de 26,7% de indução para o meio de cultura TD2₉, com 2 mg/l de 2,4-D (Fig. 22). Apesar de a auxina picloram induzir maiores taxas de formação de calo embriogénico, na manutenção é o calo induzido com 2,4-D que responde melhor. Ao contrário do que acontece no calo induzido com picloram, que tende a desdiferenciar novamente, o calo proveniente de 2,4-D mantém a capacidade de organização em massas embriogénicas durante mais tempo (dados não apresentados).

Na presença da auxina NAA não se verificou a formação de massas embriogénicas, no entanto, durante o processo de indução, ocorreu a formação de embriões em apenas 3,3% dos explantes do meio de cultura TN4₉ (Fig. 22). No final do processo foi possível verificar que as raízes se desenvolveram apenas nos meios de cultura com concentrações intermédias da hormona NAA. O mesmo aconteceu com a percentagem de explantes sem resposta que foi de 3,3% apenas no meio TN2₉ (Fig. 22).

Paralelamente foi testada a influência da presença ou ausência de BA (0,2 mg/l) no meio de micropropagação das plantas das quais se recolheram os explantes foliares, na indução de ES, utilizando-se para tal o meio de indução que revelou melhores resultados (TP4). Verificou-se que em explantes provenientes de plantas micropropagadas na presença da citocinina a taxa de indução foi de 73,3%. Com explantes provenientes de plantas micropropagadas sem BA a taxa foi significativamente mais baixa, com 43,3% de indução de calo embriogénico (Fig. 23).

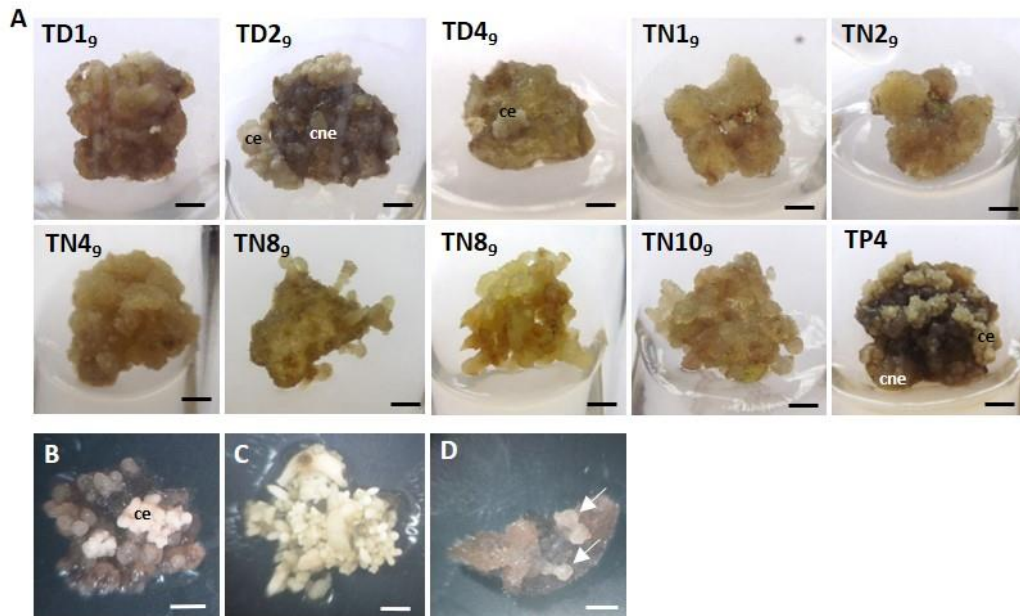


Figura 21. Explantes foliares de tamarilho após 12 semanas de indução de ES, com diferentes auxinas no meio de cultura. Nos meios de indução TD2₉, TD4₉ e TP4 é possível distinguir calo embriogénico (ce) de não embriogénico (cne). (A) Indução em todos os meios de cultura, TD1₉ – TP4; (B) Formação de calo embriogénico (ce) após 12 semanas em cultura; (C) embriões somáticos diferenciados durante a indução em TD2₉; (D) massas celulares de aspeto não embriogénico originadas em TN4₉ (seta). As barras correspondem a 2 mm.

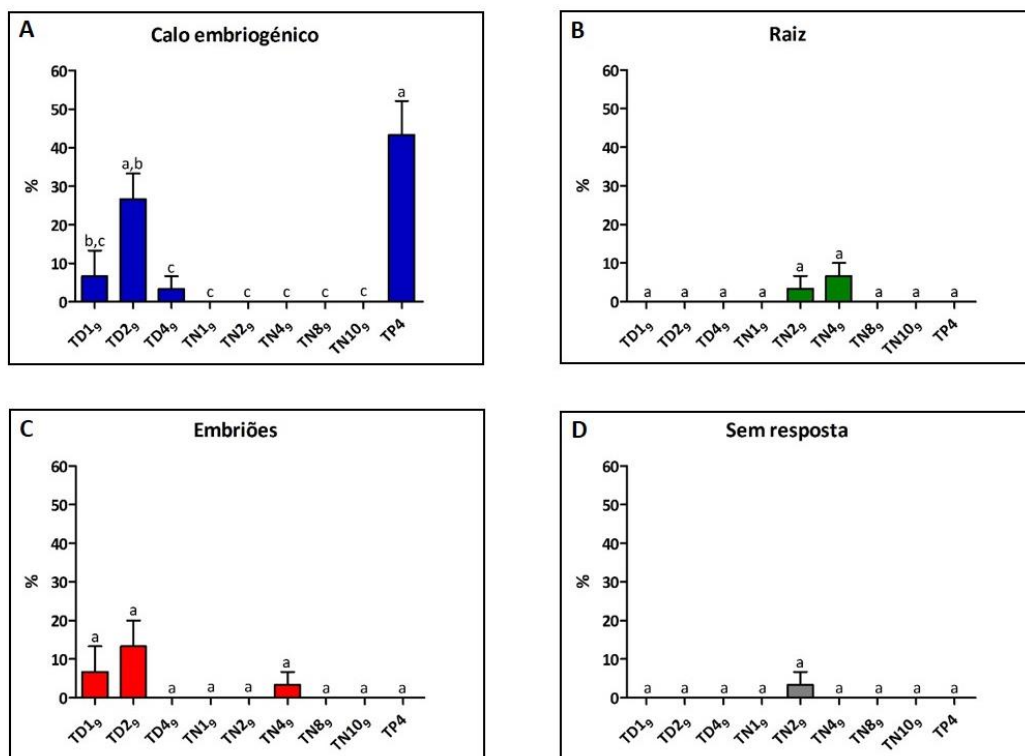


Figura 22. Taxas de indução de calo embriogénico (A), raiz (B) e embriões somáticos (C) em explantes foliares de tamarilho. O gráfico (D) apresenta a percentagem de explantes sem resposta. Os valores correspondem à média ± erro padrão de 3 réplicas com 10 explantes cada. Letras diferentes, para o mesmo tratamento, representam diferenças significativas segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$).

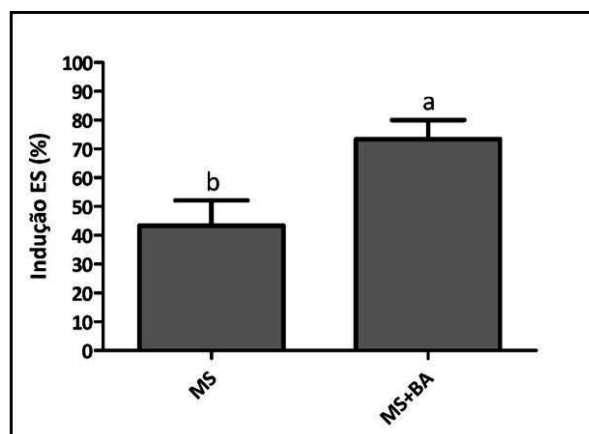


Figura 23. Influência do meio de micropropagação de plantas (MS e MS+BA) nas taxas de indução de ES a partir de explantes foliares de tamarilho em meio TP4. Os valores correspondem à média \pm erro padrão de 3 réplicas com 10 explantes cada. Letras diferentes, para o mesmo tratamento, representam diferenças significativas segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.2.4. Observação citológica e quantificação da acumulação de hidratos de carbono nas células induzidas

A observação e comparação da organização celular do calo induzido de beringela, pera-melão e tamarilho foram realizadas com o objetivo de compreender as diferenças do potencial morfogênético das células obtidas nas induções de ES. A coloração com carmim acético permitiu analisar as células quanto à sua dimensão, forma, organização e acumulação de reservas de amido, observando-se que as células do calo de beringela, induzidas no meio de cultura com 9% de sacarose, são maioritariamente redondas, com grande acumulação de amido e uma disposição não organizada (Fig. 24A, B). No calo de beringela, induzido com 3% de sacarose, as células são mais alongadas e com reservas consideravelmente mais escassas (Fig. 24C, D). As observações do calo de pera-melão, induzido em meio de cultura com NAA, permitiram visualizar células com formatos e tamanhos irregulares, dispostas aleatoriamente (Fig. 24E), algumas organizadas na forma de agregados celulares (Fig. 24F), e sem acumulação acentuada de reservas de amido. No calo de tamarilho induzido em meio de cultura com NAA (Fig. 24G, H) as células são pequenas e apresentam alguma organização na forma de agregados celulares (Fig. 24H).

A observação de uma diferença evidente na acumulação de hidratos de carbono de reserva entre as células de calo de beringela, induzidas com 9% de sacarose, e as células de pera-melão e tamarilho, induzidas em meios com os mesmos valores de

sacarose, justificou que os novos ensaios de indução na beringela se realizassem com a sacarose reduzida para 3%. A quantificação dos níveis de amido (AM) e açúcares solúveis (AS) em calos induzidos nos meios de cultura TN1₉, TN2₉, TN4₉, TN1, TN2 e TN4 permitiu verificar a existência de diferenças significativas entre as concentrações de AM e AS nos diferentes meios. Para meios de cultura com 9% de sacarose os valores de hidratos de carbono registados foram significativamente mais elevados do que para meios com 3%, com valores de 6,53 – 11,94 mg de AM e 23,85 – 31,60 mg de AS por g de calo nos meios TN1₉, TN2₉ e TN4₉ (Fig. 25). Nos meios com 3% de sacarose os níveis de AM e AS não apresentaram diferenças tão acentuadas, não ultrapassando os 2,79 mg de AM e os 4,37 mg de AS por g de calo, registadas para o meio de indução TN4.

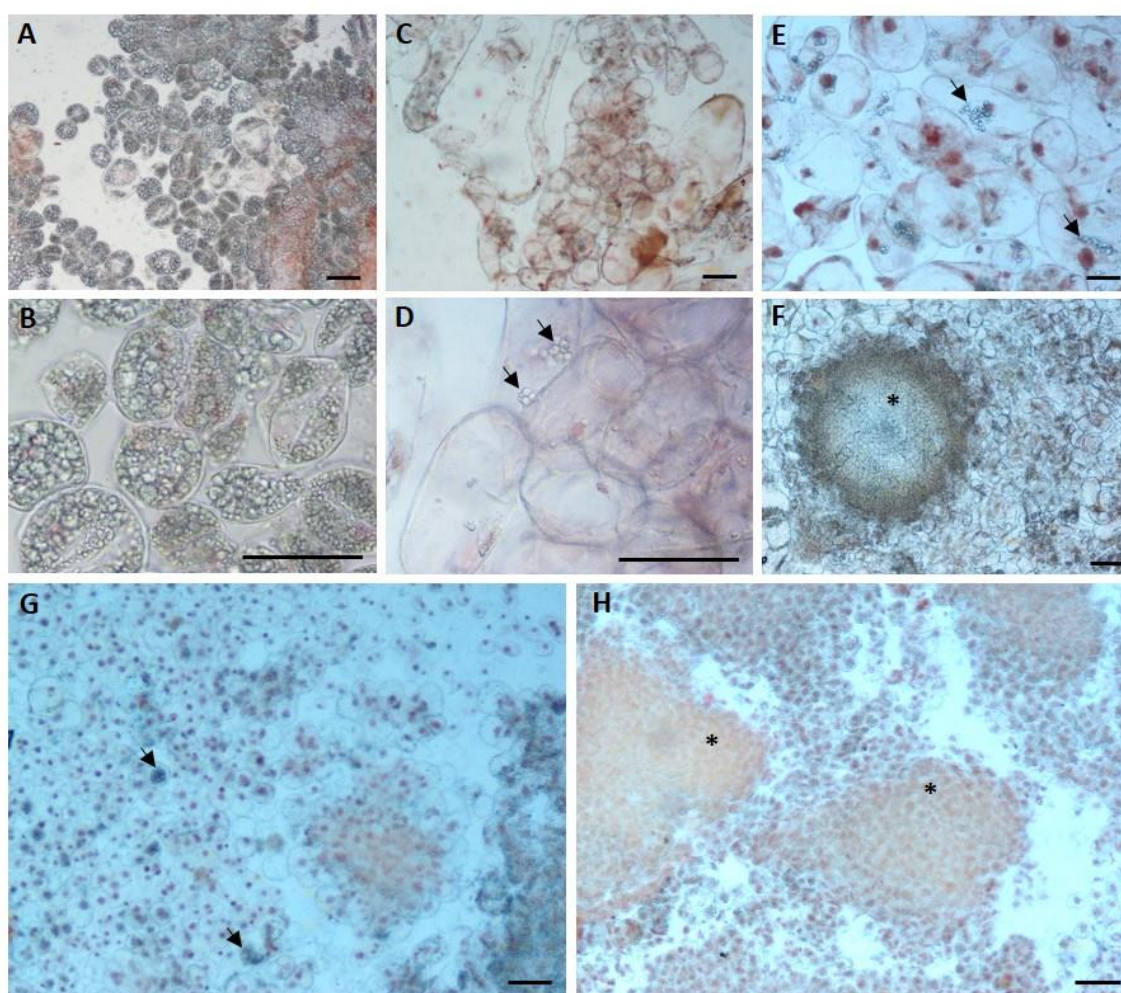


Figura 24. Comparação da organização celular e acumulação de hidratos de carbono nas células induzidas de beringela em meio de cultura com 9% de sacarose (A-B) e 3% de sacarose (C-D), pera-melão (E-F) e tamarilho (G-H). As setas indicam a presença de amido e os asteriscos a presença de agregados celulares organizados. As barras correspondem a 100 μ m.

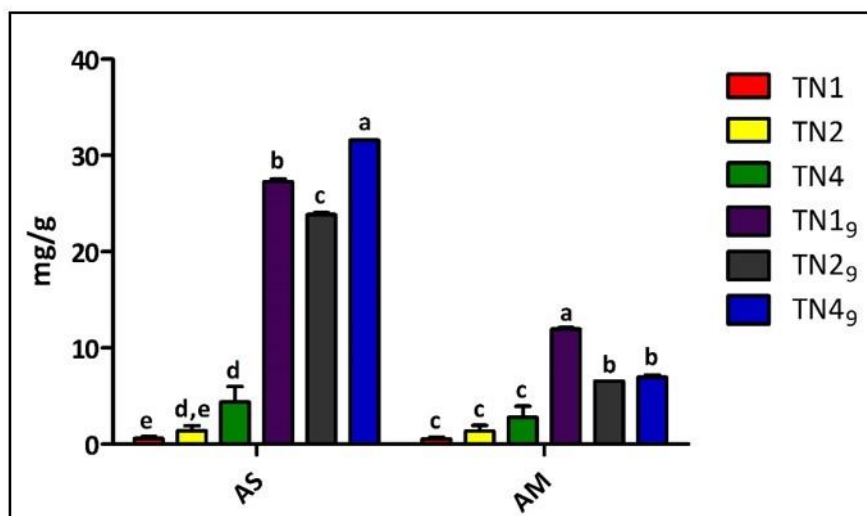


Figura 25. Níveis de açúcares solúveis (AS) e amido (AM) (mg/g de peso fresco de calo) em calo de beringela proveniente de meios de indução de ES com 3% de sacarose (TN1, TN2 e TN4) e 9% de sacarose (TN1_g, TN2_g e TN4_g). Os valores correspondem à média \pm erro padrão de 3 medições. Letras diferentes, para o mesmo tratamento, representam diferenças significativas segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$)

3.3. Maturação, germinação e aclimação de embriões somáticos

3.3.1. Beringela

Foi testado o potencial embriogénico do calo induzido da linha policlonal B, realizando-se subculturas sucessivas de calo durante 4 semanas em meio de cultura MS sem reguladores de crescimento. Ao longo das subculturas, registou-se uma diminuição do número de rebentos e plântulas, originados a partir do calo (Tabela 10). Na terceira subcultura já não ocorreu formação de novos rebentos nem de plântulas (Fig. 26).

Tabela 10. Contabilização do número de plântulas e rebentos obtidos em subculturas sucessivas de calo da linha policlonal B em meio MS sem reguladores de crescimento. As contabilizações foram realizadas num total de 5 tubos de ensaio para cada meio de indução, ao final de 4 semanas em cultura. Em alguns meios de cultura o calo oxidou impossibilitando posteriores subculturas (ox).

Meio de indução		TD1	TD2	TD4	TD8	TD10	TN1	TN2	TN4	TN8	TN10
1ª sub.	Plântulas	0	0	0	0	0	0	4	16	0	0
	Rebentos	13	26	0	0	3	8	23	54	3	2
2ª sub.	Plântulas	ox	ox	ox	0	0	0	0	0	0	0
	Rebentos	ox	ox	ox	0	8	0	0	0	0	0
3ª sub.	Plântulas	ox	ox	ox	0	0	0	0	0	ox	ox
	Rebentos	ox	ox	ox	0	0	0	0	0	ox	ox

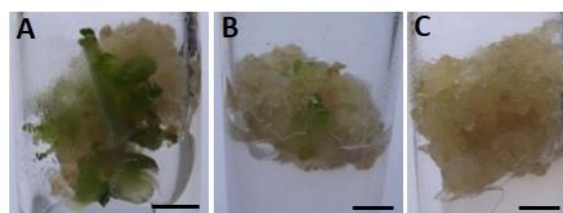


Figura 26. Aspecto dos explantes após subculturas sucessivas, de 4 semanas, em meio MS sem reguladores de crescimento, de calo da linha policlonal B, induzido em meio TN2. (A) Primeira subcultura, onde se destaca a presença de rebentos; (B) segunda subcultura; (C) terceira subcultura, já sem a presença de novos rebentos. As barras correspondem a 0,5 cm.

Para promover a conversão em plântulas, embriões somáticos da linha policlonal B foram transferidos para meio MS sem reguladores de crescimento. Nestas condições, os embriões começaram a desenvolver dando origem a rebentos e plântulas após 4 semanas em cultura (Tabela 11A; Fig. 27). Os meios de cultura que desenvolveram mais plântulas e rebentos foram os que detinham maiores concentrações da auxina NAA, TN4, TN8 e TN10 (Tabela 11A). Durante este processo surgiram rebentos sem meristema apical mas com sistema radicular (Fig. 27B), anomalias (Fig. 27D, E) e plântulas que desenvolveram normalmente (Fig. 27F). Apesar de terem surgido vários embriões somáticos anómalos, muitos deles desenvolveram plantas normais. Plântulas e rebentos foram depois transferidos para meio MS, com os macronutrientes reduzidos para metade. Após 4 semanas em cultura foi possível verificar que vários rebentos e plântulas

RESULTADOS

desenvolveram muito calo na base, o que impediu a formação do sistema radicular (Fig. 27G) e, alguns rebentos, desdiferenciaram (Fig. 27H). No entanto, houve ainda muitas plântulas que desenvolveram a parte caulinar e radicular (Fig. 27I). Ocorreu ainda o aumento do sistema radicular com a presença de uma grande quantidade de calo na base das plantas desenvolvidas (Fig. 27J). Este aspeto foi mais comum nas plantas provenientes do meio de indução com 9% de sacarose, no entanto, após a repicagem da parte apical para meio de cultura fresco, foi possível comprovar que estas plantas podem ser micropropagadas e desenvolver um sistema radicular normal (Fig. 27K). Foi ainda possível verificar que alguns dos embriões somáticos germinam criando uma bainha (Fig. 27J). O meio de cultura que apresentou maior número de plantas com um desenvolvimento normal foi o meio TN4 (Tabela 11B).

Plantas enraizadas com cerca de 5-8 cm foram aclimatadas (Fig. 28) com sucesso, sendo que às 21 semanas já haveriam frutificado (Fig. 28G) sem a utilização de aditivos no substrato.

Tabela 11. Quantificação do número de plântulas e rebentos de beringela obtidos após 4 semanas em meio de germinação (A) e do número de plantas obtidas após mais 4 semanas em meio de desenvolvimento de plantas (B) para explantes provenientes de diferentes meios de indução de ES testados.

Meio de indução	A		B	
	Plântulas	Rebentos	Plantas/Plântulas	Plantas/Rebentos
TD1	0,2±0,2	16,2±4,0	0/1	2/15
TD2	1,5±1,5	35,5±20,5	2/3	0/15
TN1	2,7±2,7	3,7±0,3	0/11	0/14
TN2	12,0±0,0	18±0,0	2/12	6/15
TN4	19,4±13,4	39±15,7	8/15	0/15
TN8	9,0±1,0	45±7,0	2/15	0/15
TN10	13±2,9	48,2±6,8	0/15	0/15

A - Os valores apresentados correspondem à média ± erro padrão para 5 explantes com embriões somáticos colocados em meio MS sem reguladores de crescimento.

B - Os valores apresentados correspondem ao número de plantas com desenvolvimento normal, de entre um total de 15 plântulas ou rebentos colocados em cultura, que registaram um desenvolvimento normal em meio MS com macronutrientes a metade, exceto nos meios de cultura em que não foi obtido esse número mínimo no final da fase de conversão.

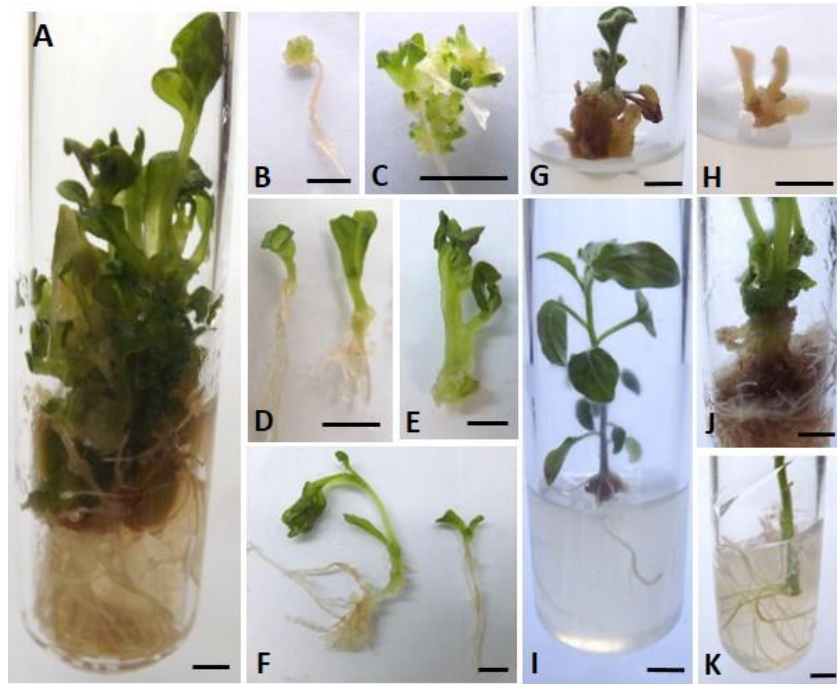


Figura 27. Conversão e desenvolvimento de embriões somáticos de beringela derivados dos tecidos da linha policlonal B. (A) Desenvolvimento dos embriões somáticos após 4 semanas em meio de cultura MS; (B-F) diferentes aspectos dos rebentos e plântulas desenvolvidas; (G-H) rebentos desdiferenciados e (I) plântula desenvolvida normalmente após 4 semanas da primeira repicagem em meio MS, com metade dos macronutrientes; (J) crescimento de calo na base das plântulas e sistema radicular muito desenvolvido; (K) capacidade de desenvolvimento normal de raízes, sem calo na base, das plântulas depois de serem repicadas novamente. As barras correspondem a 0,5 cm.



Figura 28. Aclimação de plantas beringela com origem em embriões somáticos derivados dos tecidos da linha policlonal B. (A) Planta aclimatada com 2 semanas; (B) planta com 16 semanas; (C-D) botões florais desenvolvidos após 16 semanas; (E-F) floração às 17 semanas; (G) frutificação às 21 semanas. As barras correspondem a 2 cm.

3.3.2. Tamarilho

Para verificar a capacidade embriogênica das massas celulares e a aptidão de desenvolvimento dos embriões somáticos obtidos, foi promovido o desenvolvimento e conversão de embriões somáticos em plântulas. Explantes de massas embriogênicas, juntamente com alguns embriões, foram transferidos para meio MS sem reguladores de crescimento. Nestas condições, o calo embriogênico começou a desenvolver embriões somáticos (Fig. 29A) que à sexta semana em cultura já tinham convertido em plântulas (Fig. 29B, C). O desenvolvimento embrionário não foi sincronizado e surgiram alguns embriões com fenótipos anômalos (dados não apresentados). As plantas foram posteriormente desenvolvidas após transferência para meio MS fresco, até atingirem um comprimento de, aproximadamente 5-8 cm (Fig. 29D) para poderem ser aclimatadas. Passadas 3 semanas em substrato, os tamarilhos aclimatados apresentavam um aspeto saudável e vigoroso (Fig. 29E).

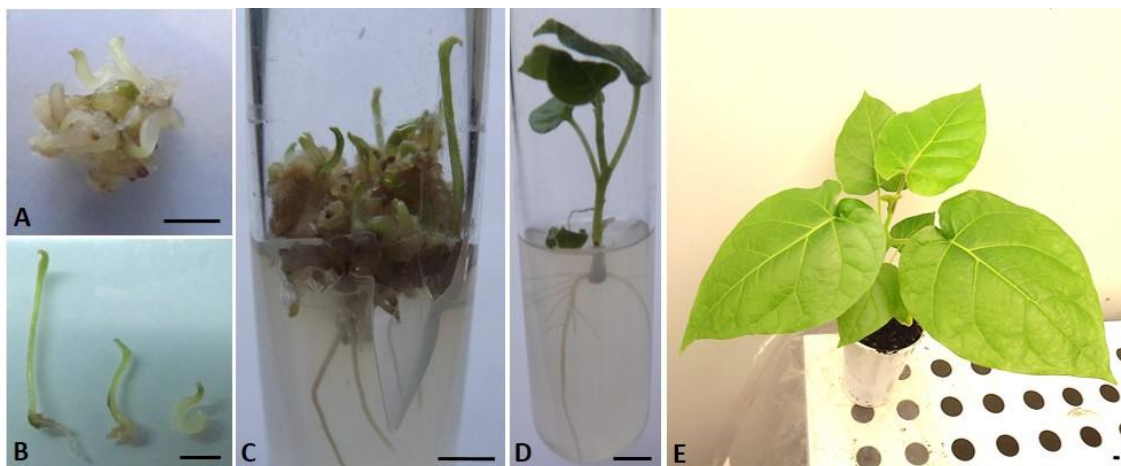


Figura 29. Conversão de embriões somáticos e aclimação de plantas *C. betacea* derivadas dos tecidos da linha policlonal TDJ. (A) Embriões somáticos; (B-C) plântulas desenvolvidas após 6 semanas de crescimento; (D) planta morfologicamente normal, derivada de um embrião somático, antes da aclimação; (E) planta de tamarilho após 4 semanas de aclimação. As barras correspondem a 0,5 cm.

3.4. Análise dos níveis de expressão da NEP-TC nos tecidos induzidos

Foi avaliada, através de RT-PCR, a presença de transcritos de NEP-TC em tecidos das três solanáceas. Tendo a presença desta proteína sido já confirmada em tecidos embriogênicos e não embriogênicos de tamarilho (Correia, 2011), o objetivo desta análise foi perceber se a sua expressão nos tecidos das restantes solanáceas em estudo seria semelhante ao descrito para o tamarilho.

A quantidade e qualidade do RNA extraído, de amostras de folhas (F) e de calo com características embriogênicas (CE) e não embriogênicas (CNE) da beringela e do tamarilho, e de folhas (F) e calo com características não embriogênicas (CNE) da peramelão (Tabela 12, Fig. 30) permitiu a síntese de cDNA para determinação por PCR da abundância dos transcritos da NEP-TC e dos seus homólogos na beringela e na peramelão. A expressão de *EFl α* como gene controlo permitiu avaliar as diferenças ao nível da expressão do gene *NEP-TC* e demonstrou ainda a integridade das amostras de cDNA obtidas, com amplificação de uma banda com 380 pb e níveis de expressão equivalentes em todas as amostras testadas (Fig. 31). Os resultados de RT-PCR com os *primers* da NEP-TC revelaram a amplificação de uma banda específica com 175 pb em todas as amostras de F, CNE e CE testadas, independentemente da espécie em estudo. A quantificação dos níveis de expressão normalizados em relação ao controlo *EFl α* , revelou os níveis de expressão mais elevados em CE da beringela e em CNE da peramelão (Fig. 31). As folhas não induzidas das 3 espécies apresentaram sempre níveis mais baixos de expressão do que os tecidos induzidos (CE ou CNE). Contrariamente ao verificado para o tamarilho, os níveis de expressão do gene homólogo do *NEP-TC* em CNE de beringela são inferiores aos observados para o calo com características embriogênicas.

RESULTADOS

Tabela 12. Quantificação e avaliação da qualidade do RNA extraído de material de tamarilho (TDJ), beringela (B) e pera-melão (PM) através da leitura em Nanodrop.

Linha	Explante	Ácidos nucleicos (ng/μl)	260/280	260/230
TDJ	F	105,2	2,11	2,29
	CE	288,4	2,11	2,01
	CNE	562,7	2,13	2,31
B	F	261,1	2,14	2,09
	CE	132	2,13	2,05
	CNE	72,6	1,82	0,86
PM	F	120,5	2,11	1,80
	CNE	109,1	2,14	2,11

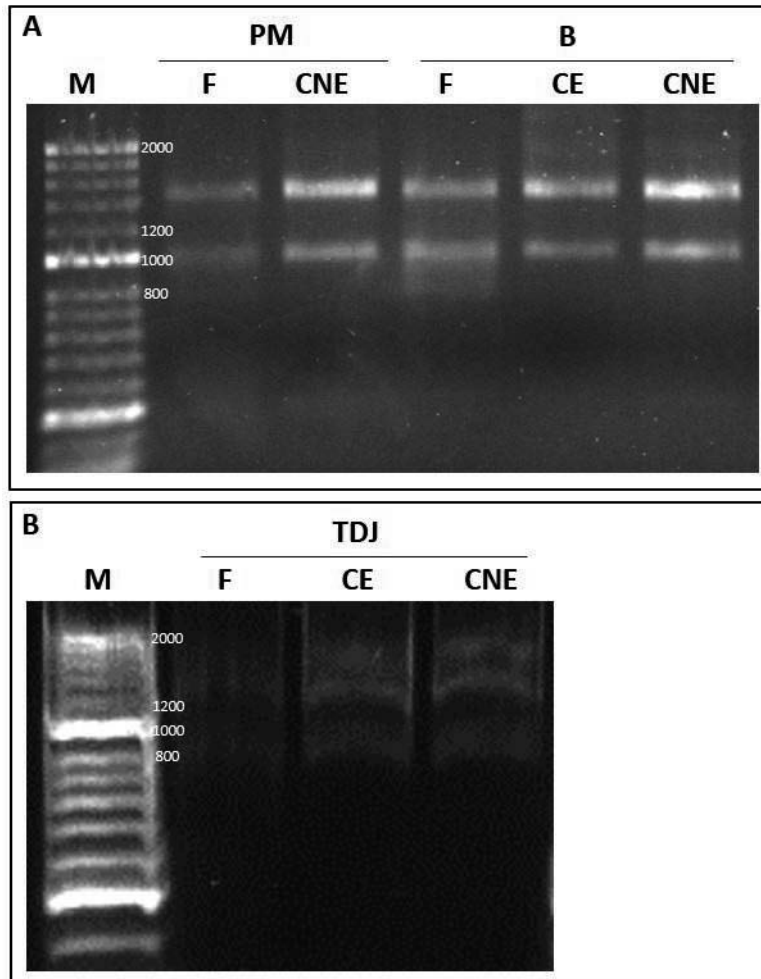


Figura 30. Electroforese, em gel de agarose a 1%, do RNA extraído de folhas (F), calo embriogénico (CE) e calo não embriogénico (CNE) de beringela (B), pera-melão (PM) (A) e tamarilho (TDJ) (B). M – marcador de DNA 0,05-2kb HyperLadder™ II (Bioline).

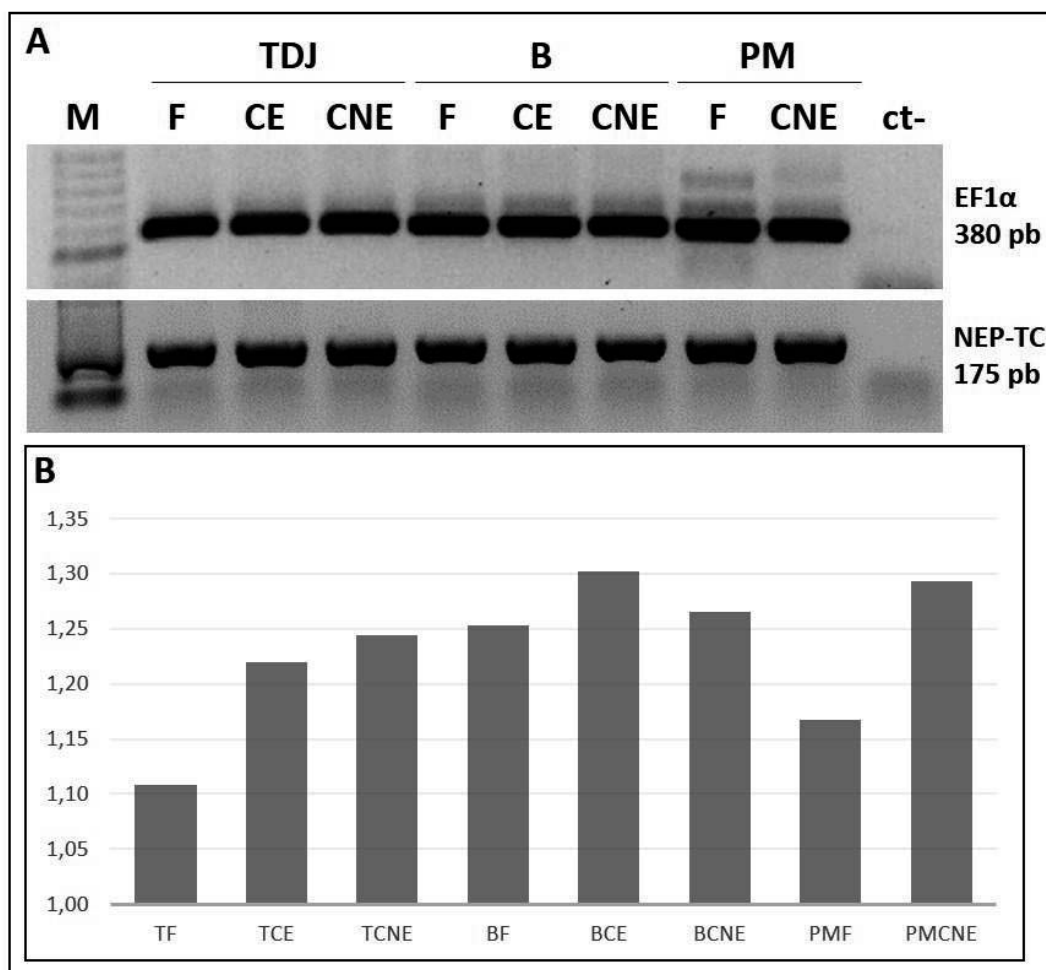


Figura 31. Expressão de *NEP-TC* e genes homólogos em folhas (F), calo com características embriogênicas (CE) e não embriogênicas (CNE) de tamarilho (TDJ) e beringela (B), e folhas (F) e calo com características não embriogênicas (CNE) de pera-melão (PM), avaliada através de RT-PCR. (A) Electroforese, em gel de agarose 1%, dos produtos de PCR amplificados com os *primers* para o *EF1α* e para o *NEP-TC*; M – marcador de DNA 0,05-2kb HyperLadder™ II (Bioline); (B) níveis de expressão do gene *NEP-TC* e homólogos, normalizada através da expressão do *EF1α*.

3.5. Indução de ES em linhas de *Arabidopsis thaliana knockout* para genes da família das SpoU metiltransferases de RNA

A confirmação da homozigotia das plantas selecionadas para análise foi feita através de PCR para sequências específicas da inserção das linhas mutantes. Para este efeito, foi extraído o DNA de 4 plantas de cada uma das linhas *knockout* (KO) e de uma planta *wild type* (WT) como controle. A quantificação, qualidade e integridade do DNA encontra-se apresentada na Tabela 13. Todas as plantas analisadas eram homozigóticas

RESULTADOS

para a inserção, sendo observada apenas uma banda, consistente com a inserção do T-DNA em ambos os alelos do gene (Fig. 32).

Tabela 13. Quantificação e avaliação da qualidade do DNA das linhas *knockout* (MT5 e KO7) e WT de *Arabidopsis* através da leitura em Nanodrop.

Linha	Ácidos nucleicos (ng/μl)	260/280	260/230	
MT5	1	348,95	2,13	
	2	194,7	2,15	
	3	234,6	2,13	
	4	437,6	2,14	
KO7	1	315,45	2,13	
	2	501,4	2,13	
	3	263,05	2,15	
	4	243	2,14	
WT	1	224	217	175

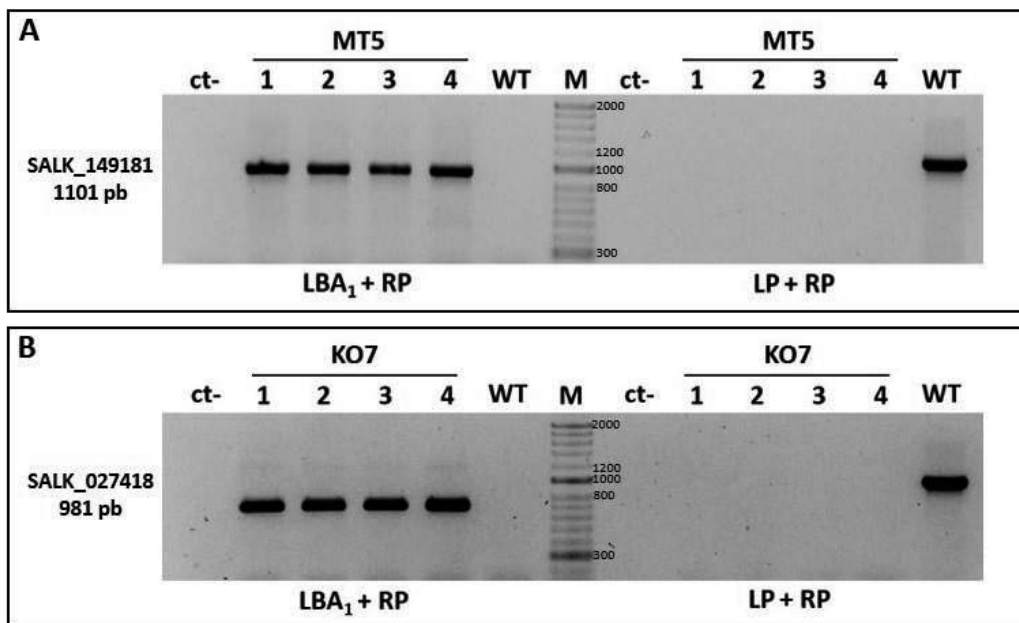


Figura 32. Identificação das plantas homocigóticas para a inserção de T-DNA nos genes *AT5G15390* da linha MT5 (**A**) e *AT4G15520* da linha KO7 (**B**) através de PCR. M – marcador de DNA 0,05-2kb HyperLadder™ II (Bioline).

A indução de embriogênese somática foi feita em embriões zigóticos imaturos, que após 4 semanas em meio de indução evidenciavam respostas como a formação de calo, embriões somáticos e pelos radiculares (Fig. 33). No primeiro ensaio, em que indução foi feita em embriões provenientes de siliquas imaturas de plantas com 8 semanas, uma grande percentagem de explantes (cerca de 33% em MT5 e 41% em KO7 e em WT; Fig. 33G) formou calo com características organogênicas e fotossintéticas (COF), com formação de rebentos (Fig. 33B) e coloração verde (Fig. 33C). Foi também frequente a diferenciação de estruturas semelhantes a pelos radiculares (CPR) a partir do calo formado (Fig. 33C, D). Alguns explantes mostraram formação de calo, sem formação de embriões somáticos ou de qualquer outra estrutura organogênica (Fig. 33A). Da mesma forma, alguns embriões zigóticos não responderam e poucos germinaram precocemente em detrimento da formação de calo ou diferenciação de embriões somáticos (Fig. 33F). A frequência de formação de embriões somáticos foi inferior a 20%, no entanto, é de notar que, apesar de não terem sido registadas diferenças significativas, a linha KO7 mostrou taxas mais elevadas (18%) relativamente a MT5 (10%) e WT (15%) (Fig. 33G). Os embriões somáticos formados apresentavam uma coloração verde (Fig. 33E) e frequentemente anomalias, tanto nas linhas KO como na linha WT.

Partindo de massas de calo organogênico formadas neste ensaio, foram efetuadas subculturas de calo, para verificar se estas células teriam capacidade de iniciar novos ciclos de embriogênese. O que se verificou foi apenas um crescimento de algumas das massas colocadas em cultura, não havendo sinais de organização para a formação de novos embriões somáticos (dados não apresentados).

Num segundo ensaio, foi feita nova indução, de forma a testar o efeito do estágio de maturação dos embriões zigóticos na eficiência do processo de indução. As taxas de indução de embriões somáticos obtidas neste ensaio foram muito mais diminutas comparativamente com o primeiro ensaio, não ultrapassando o valor de 3%, observado para as linhas WT e KO7 (Fig. 33H).

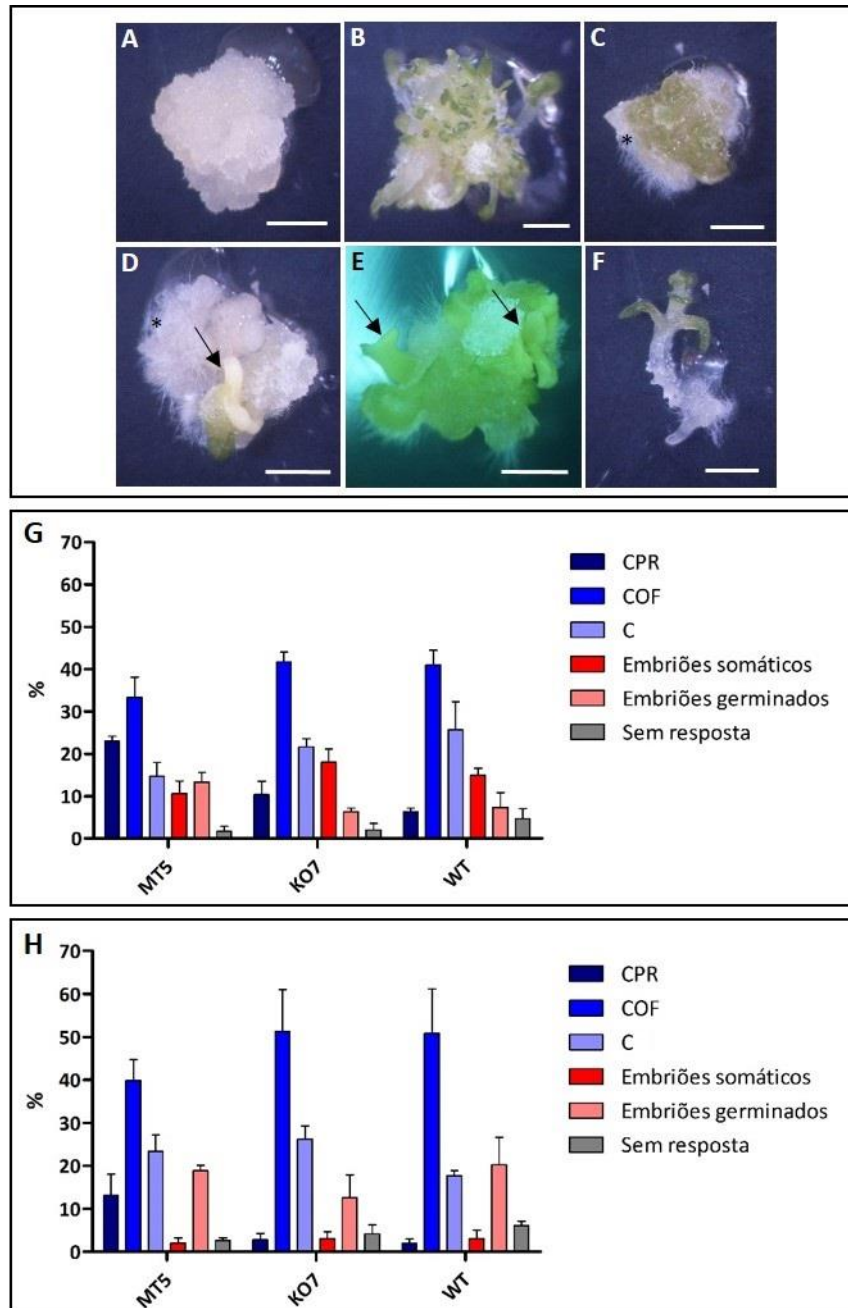


Figura 33. Indução de ES nas linhas *knockout* de *Arabidopsis* para os genes *AT5G15390* (MT5), *AT4G15520* (KO7) e na linha WT. (A) Calo desdiferenciado; (B) formação de rebentos; (C) calo com características organogênicas e fotossintéticas; (D-E) presença de embriões somáticos nos explantes descrita pela seta; (F) embrião zigótico germinado precocemente. As barras correspondem a 2 mm. (G-H) Percentagem de formação de calo com pelos radiculares (CPR), calo com características organogênicas e fotossintéticas (COF), calo (C), embriões somáticos, embriões germinados e explantes sem resposta na cultura de embriões zigóticos imaturos da linha *wild type* (WT) e linhas *knockout* MT5 e KO7 de *Arabidopsis*, após 1 mês em cultura no meio de indução B5 suplementado com 0,1 mg/L de 2,4-D, de explantes provenientes de uma planta com 8 semanas de crescimento (G) e de uma planta com 14 semanas de crescimento (H).

3.5.3. Observação do desenvolvimento morfológico

Durante a primeira fase de recolha de dados, a comparação entre as plantas WT e as linhas KO não revelou diferenças fenotípicas acentuadas no que diz respeito à taxa de crescimento e desenvolvimento da planta durante todo o seu ciclo de vida (Tabela 14). No entanto, a linha MT5 foi a que desenvolveu 11 folhas da roseta (estádio 1.11, Tabela 14) mais tardiamente e cujos botões florais surgiram mais precocemente (estádio 5.10, Tabela 14). Além disso, e apesar de não terem sido recolhidos dados relativamente ao porte da planta, após 4 semanas em cultura foi possível verificar que as plantas WT são mais altas do que as plantas das linhas KO (Fig. 34), o que também se verifica pelo valor da distância da primeira ramificação à base do pé floral (Tabela 15).

Na segunda fase do ensaio morfogénico, foram registadas algumas diferenças nos dados recolhidos no final do desenvolvimento das *Arabidopsis* (Tabela 15). No que diz respeito ao tamanho final da roseta, KO7 apresenta o maior diâmetro, com 36,87 mm de comprimento, seguido da WT, com 32,92 mm, e da MT5, com 31,08 mm (Tabela 15). Quanto à distância da primeira ramificação à base do pé floral, a linha WT apresenta o maior valor, com 20,14 mm, seguido da MT5, com 19,23 mm, e finalmente da KO7, com 15,33 mm (Tabela 15). O enraizamento também foi cuidadosamente analisado, sendo que foram registadas diferenças significativas entre as duas linhas KO e a linha WT quanto ao comprimento das raízes primárias, sendo que para as duas linhas KO foi registado um comprimento médio de cerca de 6 cm, ao contrário da WT que apenas atingiu 3,9 cm (Fig. 35B). O mesmo se verificou para o número de raízes secundárias, onde as linhas MT5 e KO7 exibiram um número médio de 31,7 e 33,3, respetivamente, e a WT apenas 19,2 (Fig. 35B). Durante a análise do sistema radicular foi também possível verificar que as linhas KO apresentam maior número de pelos radiculares comparativamente à linha WT (Fig. 36).

RESULTADOS

Tabela 14. Estádios de crescimento (de acordo com a Figura 11) registados durante o período de análise do desenvolvimento morfológico das linhas de *Arabidopsis*.

Nº estágio	Descrição	MT5	KO7	WT
		Dias ^a ±SEM	Dias±SEM	Dias±SEM
0.0	Germinação da semente			
0.1	Embebição da semente	2,0±NA ^b	2,0±NA	2,0±NA
0.5	Radicula emerge do tegumento	3,8±0,0	3,8±0,1	3,9±0,2
0.7	Hipocótilo e cotilédones emergem do tegumento	5,0±0,0	5,0±0,0	4,9±0,1
1	Desenvolvimento foliar			
1.0	Cotilédones totalmente abertos	5,3±0,0	5,2±0,0	5,5±0,2
1.02	2 Folhas da roseta (> 1mm comprimento)	9,5±0,0	9,5±0,0	9,5±0,0
1.03	3 Folhas da roseta (> 1mm comprimento)	12,4±0,6	12,3±0,6	12,2±0,3
1.04	4 Folhas da roseta (> 1mm comprimento)	13,6±0,6	12,9±0,4	13,2±0,6
1.05	5 Folhas da roseta (> 1mm comprimento)	15,8±0,9	15,9±0,5	15,6±1,0
1.06	6 Folhas da roseta (> 1mm comprimento)	17,7±0,4	17,7±0,5	17,5±0,8
1.07	7 Folhas da roseta (> 1mm comprimento)	18,7±0,7	18,7±0,4	18,3±0,4
1.08	8 Folhas da roseta (> 1mm comprimento)	22,0±0,4	21,1±0,6	21,0±0,5
1.09	9 Folhas da roseta (> 1mm comprimento)	25,0±0,4	24,6±0,2	24,2±0,3
1.10	10 Folhas da roseta (> 1mm comprimento)	25,7±0,5	26,3±0,6	24,2±1,4
1.11	11 Folhas da roseta (> 1mm comprimento)	29,0±0,4	26,7±0,6	26,4±1,0
1.12	12 Folhas da roseta (> 1mm comprimento)	ND ^c	ND	ND
1.13	13 Folhas da roseta (> 1mm comprimento)	ND	ND	ND
1.14	14 Folhas da roseta (> 1mm comprimento)	ND	ND	ND
5	Inflorescência emerge			
5.10	Primeiros botões florais visíveis na roseta	19,9±0,7	21,2±0,4	21,4±1
6	Floração			
6.00	Primeiro botão floral abre	26,1±0,3	27,3±0,1	26,3±0,6
7	Produção de siliquas			
7.00	1ª Siliqua a surgir	28,0±0,3	27,8±0,6	28,1±0,6
8	Amadurecimento das siliquas			
8.00	Primeira siliqua madura	43,0±0,0	42,8±0,1	42,5±0,1
9	Início da senescência.			
9.70	Senescência completa	ND	ND	ND

^aMédia dos dias a partir da sementeira, inclui 3 dias de vernalização a 4°C para sincronizar a germinação.

^bNA, não aplicável.

^cND, não determinado.

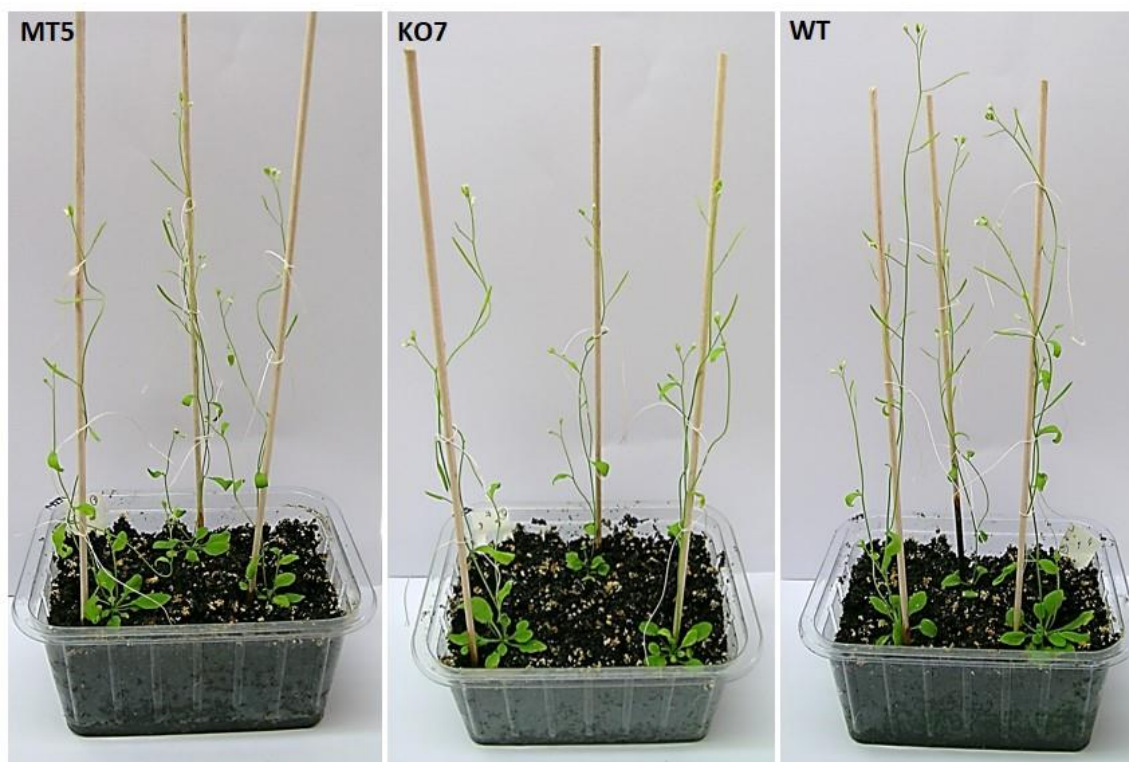


Figura 34. Plantas de *Arabidopsis knockout* e *wild type* após 4 semanas de cultura em substrato.

Tabela 15. Medições efetuadas em diferentes estádios do ensaio de desenvolvimento morfológico das linhas de *Arabidopsis*.

Medição	Unidade	MT5	KO7	WT
		Média±SEM	Média±SEM	Média±SEM
Roseta (passagem para terra)	mm	14,54±0,72	15,80±0,80	17,14±1,42
Roseta (1ª flor aberta totalmente)	mm	22,39±1,14	27,20±1,49	24,64±1,45
Roseta (final da floração)	mm	31,08±1,92	36,87±2,02	32,92±2,59
Nº de pés florais	Contagem	3,31±0,20	3,06±0,27	3,14±0,28
Nº de ramificações (do pé principal)	Contagem	2,85±0,37	2,20±0,11	2,57±0,20
Distância da primeira ramificação à base do pé floral	mm	19,23±3,82	15,33±2,77	20,14±3,16

RESULTADOS

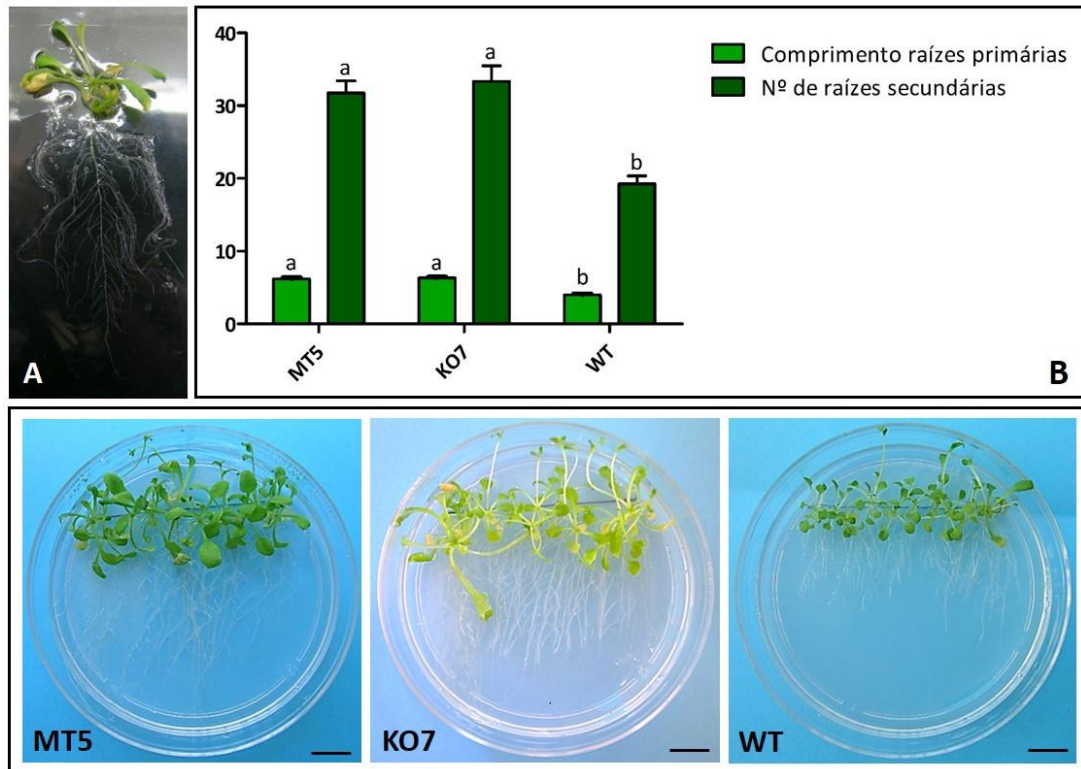


Figura 35. Ensaios de análise do desenvolvimento radicular das linhas *knockout* (MT5 e KO7) e *wild type* (WT) de *Arabidopsis*. (A) Detalhe das raízes da linha KO7; (B) comprimento das raízes primárias e nº de raízes secundárias de todas as linhas em estudo; os valores correspondem à média e erro padrão de 3 réplicas com 10 plantas cada. Letras diferentes, para o mesmo tratamento, representam diferenças significativas segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$). Linhas **MT5**, **KO7**, **WT** após 3 semanas em cultura; as barras correspondem a 1 cm.



Figura 36. Observação à lupa dos pelos radiculares de plantas das linhas **MT5**, **KO7** e **WT**, após 3 semanas em cultura. As barras correspondem a 1 mm.

4. DISCUSSÃO



4.1. Estabelecimento *in vitro* de linhas policlonais de beringela, pera-melão e tamarilho

A maioria das espécies vegetais pode ser regenerada *in vitro* através de várias metodologias, graças à grande evolução que ocorreu na vasta área dos procedimentos da cultura de tecidos. As células vegetais, mesmo diferenciadas, retêm a capacidade de reverterem a um estado meristemático e diferenciar uma nova planta (Chawla, 2010).

No que diz respeito à micropropagação de beringela, dada a extensa bibliografia existente (Kantharajah e Golegaonkar, 2004; Magioli e Mansur, 2005) para esta espécie e a sua capacidade de regeneração, não houve dificuldades na propagação do material vegetal estabelecido por micropropagação em meio MS sem reguladores de crescimento.

Apesar de não existirem muitos estudos sobre a cultura *in vitro* de pera-melão, encontram-se referidos alguns exemplos correlativos de outras solanáceas, como a cultura de secções apicais de rebentos para *Capsicum chinense* e meristemas apicais de *Capsicum annum*, ou a análise do efeito de BAP e/ou NAA em meio MS na multiplicação de rebentos e aclimação de plantas estabelecidas *in vitro* em *Withania somnifera* (Cavusoglu e Sulusoglu, 2013). Nos ensaios realizados, testou-se o meio de micropropagação estabelecido para *Cyphomandra betacea* para o desenvolvimento de rebentos - meio MS suplementado com 0,2 mg/l de BA (Correia *et al.*, 2011). Foi também testado meio MS suplementado com 1 mg/l de BA, um dos meios de cultura que apresentou melhores resultados no estudo de Cavusoglu e Sulusoglu (2013). Constatou-se que a resposta observada está de acordo com a literatura disponível (Pauli, 1988; Cavusoglu e Sulusoglu, 2013), ou seja, quanto maior a concentração de BA no meio de cultura maior o número de rebentos por explante. No entanto, pelo facto de não terem sido notadas diferenças no desenvolvimento dos explantes, e pelo objetivo da micropropagação neste estudo ser apenas a obtenção de material vegetal para a utilização nos ensaios de ES e não a propagação em larga escala, optou-se pelo meio suplementado com 0,2 mg/l de BA para a micropropagação da pera-melão.

O estabelecimento *in vitro* de lenhosas, como o tamarilho, encontra frequentemente vários entraves, como por exemplo a exsudação e oxidação de taninos e polifenóis, o elevado número de contaminações endógenas, ou a recalcitrância de determinados explantes e genótipos (Bonga, 2010). No entanto, neste trabalho, o estabelecimento das linhas de tamarilho não registou dificuldades, visto que estas foram estabelecidas a partir de sementes, e não de material adulto. A desvantagem ao utilizar

plantas jovens em detrimento de espécimes adultos na micropropagação é que o desenvolvimento do potencial genético das primeiras é menos conhecido do que o das árvores adultas (Bonga, 2010). No entanto, o objetivo deste trabalho não era a clonagem mas sim a obtenção de material para ensaios ulteriores de ES.

Os procedimentos utilizados permitiram estabelecer com sucesso material vegetal das três espécies para os ensaios de indução de ES em explantes foliares.

4.2. Indução de ES em explantes foliares de beringela, pera-melão e tamarilho

A ES é um fenómeno baseado na substituição do padrão de expressão genético já existente no explante para um novo programa de expressão genética embriogénica (Zavattieri *et al.*, 2010) demonstrando a flexibilidade geral do plano de desenvolvimento das plantas. É reconhecido como um dos mais importantes métodos de micropropagação (Zimmerman, 1993), tendo enorme potencialidade para servir de sistema modelo em estudos moleculares, citológicos, fisiológicos e dos padrões de desenvolvimento relativos à embriogénese das plantas (Fehér *et al.*, 2003, Figueroa *et al.*, 2006).

Várias solanáceas têm sido regeneradas através de técnicas de cultura *in vitro*, incluindo a indução de ES. Desde as primeiras induções de ES em Solanaceae, no tabaco, por Haccius e Lakshmanan (1965), e na beringela, por Yamada *et al.* (1967), que este processo tem sido comprovado noutras espécies desta família (Guimarães *et al.*, 1988).

Um objetivo importante a atingir seria o estabelecimento de um paralelismo entre os sistemas de indução de ES para as três solanáceas em estudo, no entanto não foram induzidos tecidos embriogénicos, nem obtidos embriões somáticos para as condições testadas com os explantes de pera-melão.

Alguns dos resultados obtidos na avaliação da resposta dos tecidos foliares de beringela, face a diferentes condições de indução de ES, são suportados pela literatura já existente. A frequência de indução de ES mais elevada é atingida com níveis de sacarose mais baixos (Gleddie *et al.*, 1983) e a auxina mais eficaz é o NAA, relativamente ao 2,4-D (Kantharajah e Golegaonkar, 2004).

Perante os resultados obtidos foi possível concluir que os tecidos foliares de beringela apresentam potencial mais elevado de formação de embriões somáticos em meios de cultura com 4 e 8 mg/l de NAA, contendo 3% de sacarose, que se manifesta entre a 6ª e a 8ª semana em cultura. Estas condições representam uma menor eficiência

relativamente à descrita em estudos anteriores (Sharma e Rajam, 1995a), nos quais foram obtidos níveis mais elevados de indução de ES, com explantes foliares, utilizando 2 mg/l de NAA e obtendo embriões somáticos em estado globular em apenas 2 semanas. No entanto, as diferenças descritas estão provavelmente relacionadas com o facto do genótipo utilizado nos ensaios ser diferente, sendo este um dos fatores que mais influencia os resultados de indução de ES em beringela (Kantharajah e Golegaonkar, 2004). Enquanto que no presente trabalho foi utilizada a variedade Black Beauty, Sharma e Rajam (1995a) utilizaram Pusa Purple Long. A concentração de 8 mg/l de NAA ultrapassa o intervalo de concentrações definido como ótimo, para a indução de ES em explantes foliares (2-6 mg/l) (Kashyap *et al.*, 2003). No entanto, Gleddie *et al.* (1983) demonstraram uma elevada frequência de ES em explantes foliares de 7 cultivares diferentes de beringela em meio MS suplementado com 10 mg/l de NAA.

As citocininas têm sido importantes na indução de ES em algumas espécies e a sua combinação com uma auxina é por vezes essencial no desencadear deste processo (Chawla, 2010). Geralmente, elevados níveis de auxina e baixos de citocinina favorecem a indução de embriogénese somática (Sidhu *et al.*, 2014). Foi testada a influência da adição de uma citocinina (KIN) a um dos meios de cultura com melhores taxas de indução de ES (TN4). Dado que esta combinação já provou ser favorável nos ensaios de ES em beringela (Rao e Singh, 1991), seria de esperar um aumento das taxas de indução de calo embriogénico com o acrescento de KIN ao meio de cultura contendo NAA. No entanto, a citocinina inibiu a resposta embriogénica induzida pelo NAA. Apesar de tudo, as duas hormonas atuaram sinergicamente no crescimento de calo, tal como referido por Gleddie *et al.* (1983).

Foi observada uma correlação entre o desenvolvimento de raízes adventícias, e de embriões somáticos, em cotilédones do cultivar Imperial Black Beauty, na resposta a diferentes concentrações de NAA. A indução de raízes foi proporcionada com baixas concentrações (0,1-0,5 mg/l), níveis intermédios favoreciam embriogénese (1,0-5,0 mg/l) e elevadas concentrações (10-50 mg/l) a formação de calo (Fobert e Webb, 1988). Apesar do estudo ter sido realizado com cotilédones e não com explantes foliares, geralmente, na beringela, baixos níveis de NAA traduzem-se na formação de raízes (Sidhu *et al.*, 2014). Em todas as concentrações de NAA testadas ocorreram os três tipos de resposta acima mencionados, no entanto, com o aumento da concentração hormonal a ocorrência de raízes diminuiu, o que vai de encontro ao indicado na literatura, apesar da diferença do intervalo de valores.

Em comparação com os dados obtidos com NAA, as secções foliares em cultura na presença de 2,4-D apresentaram taxas de indução mais reduzidas, tal como consta na literatura (Kantharajah e Golegaonkar, 2004). A diferença na ocorrência de rizogénese foi abrupta, sendo que com a auxina 2,4-D não se desenvolveram raízes, em contraste com a grande diferenciação que ocorreu nos meios de cultura com NAA. Não existem dados comparativos na literatura publicada, visto que 2,4-D foi usado na indução em protoplastos isolados de folhas, hipocótilos e cotilédones (Kantharajah e Golegaonkar, 2004). Esta auxina é menos utilizada, dado que os resultados proporcionados são menos eficazes, não obstante apresenta uma vantagem face a NAA no processo de indução de ES, sendo que a variação somaclonal é mais elevada em plantas obtidas com a hormona NAA, comparativamente com 2,4-D (Hitomi *et al.*, 1998). Apesar da variação somaclonal ser uma plausível fonte de variedade na beringela (Hitomi *et al.*, 1998), com possível interesse prático na obtenção de novas variedades, o aparecimento de somaclones continua a ser um acontecimento indesejado pelos investigadores.

Numa abordagem inicial, foi avaliada a resposta dos tecidos foliares de beringela face a condições de indução de ES semelhantes às descritas para o tamarilho (Correia e Canhoto, 2012), utilizando uma concentração de 9% de sacarose e permanecendo os explantes até às 14 semanas em cultura. Como já foi referido anteriormente, as concentrações de sacarose adequadas para a indução de ES na beringela são reduzidas (Gleddie *et al.*, 1983), sendo que concentrações mais elevadas reduzem o potencial embriogénico dos tecidos desta espécie tal como se observou. Estes dados foram também suportados pelas observações citológicas, onde foi possível constatar que nas células de calo induzido com 9% de sacarose a acumulação de amido era excessiva. É ainda de referir que, de entre os meios de cultura com 9% de sacarose, TN4₉ registou a taxa de indução de embriões somáticos mais elevada e também as taxas de amido mais reduzidas. Constatou-se portanto que quanto maior a concentração de NAA, quer para meios com 9% ou com 3% de sacarose, menor a acumulação de amido e maiores as taxas de açúcares simples, o que revela uma maior eficiência metabólica das células e conseqüentemente uma melhor resposta embriogénica. No que diz respeito ao tempo em cultura, que também foi testado para reduzidas concentrações de sacarose (3%), após 14 semanas, as massas celulares apresentavam-se oxidadas, não se observando calo viável, concluindo-se que o tempo de desdiferenciação e reprogramação das células dos tecidos foliares de beringela é bastante mais curto do que o das células de tamarilho. No entanto, apesar da oxidação

do material desdiferenciado, ocorreu a formação de embriões somáticos. Compostos oxidativos, indutores de stresse, aumentam os níveis endógenos de auxinas (Zavattieri *et al.*, 2010), o que poderá ter estimulado a diferenciação dos embriões somáticos.

No presente trabalho, foram utilizados explantes foliares de tamarilho (com o objetivo de estabelecer uma similaridade com o protocolo da beringela) testando 3 auxinas diferentes: 2,4-D, NAA e picloram.

Os resultados obtidos vão de encontro aos descritos na literatura, visto que com as auxinas 2,4-D e picloram ocorreu a formação de calo embriogénico, num processo de indução *two-step*, e com a auxina NAA apenas se diferenciaram embriões somáticos num processo *one-step* (Lopes *et al.*, 2000). Apesar do processo de indução de ES com a auxina 2,4-D ser considerado *two-step* foram obtidos embriões somáticos, juntamente com tecido embriogénico, no final do tempo de indução. Guimarães *et al.* (1988) já tinham observado que massas de calo embriogénico que permanecem no meio original de indução durante extensos períodos de tempo tendem, ocasionalmente, a diferenciar embriões somáticos. Nos meios de indução testados com a auxina NAA a taxa de indução de ES foi extremamente baixa, sendo que apenas se formaram embriões somáticos no meio de cultura TN4₉ (3,3% de indução). Em estudos anteriores de indução de ES no tamarilho, foram testadas várias concentrações de 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).

Tal como foi referido anteriormente, o processo de indução de ES com a auxina NAA é *one-step*, não ocorrendo a formação de calo embriogénico (Lopes *et al.*, 2000). No entanto, observações citológicas realizadas demonstraram que os tecidos desenvolvidos em meios de indução com NAA apresentam organização na forma de agregados celulares. Estes dados poderão indicar a presença de características embriogénicas neste calo. No entanto já foi verificado que calo induzido a partir de embriões zigóticos maduros na presença desta auxina é incapaz de manter o seu potencial embriogénico, perdendo rapidamente a aptidão para diferenciar novos embriões somáticos (Canhoto *et al.*, 2005).

Tendo em conta o meio de indução que apresentou resultados mais satisfatórios (TP4), foi também avaliada a resposta de explantes foliares provenientes de tamarilhos micropropagados em MS e MS com BA, testando a influência da citocinina utilizada na

propagação de ápices e segmentos nodais na indução de ES. Os resultados obtidos demonstraram níveis mais elevados de formação de tecido embriogénico na indução com folhas provenientes de plantas micropropagadas em MS com BA, sugerindo que a citocinina, aplicada para a proliferação de rebentos durante a micropropagação, tem um efeito estimulador da capacidade embriogénica.

Apesar dos sistemas de indução de ES da beringela e do tamarilho serem distintos, os tecidos de ambos detêm a capacidade de desdiferenciação para formar dois tipos de tecido diferentes, calo com capacidade embriogénica e calo sem capacidade embriogénica. No entanto, o calo embriogénico do tamarilho apresenta características que não são visíveis no calo de beringela, tais como a aparência organizada em *clusters* esbranquiçados. O calo de beringela assemelha-se, visualmente, ao calo não embriogénico do tamarilho, apesar de não ser friável, sendo por vezes difícil de o separar. Já muito se sabe acerca da indução de ES na beringela, e dada a facilidade da manipulação *in vitro* também têm sido estudados os aspetos moleculares e fisiológicos deste processo. No entanto, a utilidade prática deste procedimento ainda não foi totalmente explorada. Um protocolo eficiente, com elevadas taxas de regeneração, juntamente com um sistema que permita a sua aplicabilidade em campo, com grandes frequências de conversão de embriões somáticos, seria revolucionário (Kantharajah e Golegaonkar, 2004). Comparativamente com outras solanáceas, como por exemplo o tomate e a batata, a cultura *in vitro* de beringela e tamarilho apresenta vantagens, tendo em conta que já existem protocolos de indução de ES explorados e estabelecidos. No tomate, já foram induzidos embriões somáticos a partir de protoplastos, hipocótilos e plântulas intactas (em crescimento num meio de cultura com elevadas concentrações de citocinina). No entanto, apesar do reconhecimento da importância e utilidade que teria um procedimento eficiente para propagação em larga escala desta solanácea, ainda não estão disponíveis protocolos eficazes (Bhatia *et al.*, 2004). O mesmo acontece com a batata, que baseado em alguns protocolos de embriogénese polínica, até finais do séc. XX, era considerada uma espécie recalcitrante, até começarem a ser utilizados explantes somáticos maduros e imaturos noutros estudos (Sharma e Millam, 2004).

Apesar das várias tentativas efetuadas no decorrer deste trabalho, não foi conseguido um protocolo de indução de ES em pera-melão. Tanto os explantes foliares, como os pecíolos formaram calo e raízes, tal como já foi conseguido pelos processos de

organogénese descritos com as combinações hormonais de zeatina e IAA (Atkinson e Gardner, 1991) e TDZ e IAA (Jordan *et al.*, 1993). Nestes estudos, também foi conseguida a regeneração de rebentos a partir de calo.

As observações citológicas de calo, obtido a partir dos ensaios com tecidos de pera-melão, demonstraram semelhanças com o calo de tamarilho no que diz respeito aos reduzidos níveis de amido e à presença de agregados celulares. Os reduzidos níveis de amido comparativamente aos observados nos tecidos da beringela, com a mesma percentagem de sacarose (9%), permitem estipular que a concentração de sacarose utilizada poderá ser correta para os ensaios com pera-melão.

4.3. Maturação, germinação e aclimação de embriões somáticos

4.3.1. Beringela

Talvez o aspeto mais estudado da ES em beringela, e noutras espécies, tenha sido a indução, desenvolvimento e maturação dos embriões somáticos. Em algumas espécies altamente regeneráveis (por exemplo a cenoura e a alfalfa) já foi obtida uma clara separação de estádios morfogénicos, através da regulação dos requisitos físicos e ambientais. No entanto, ainda não foram feitas muitas distinções no que diz respeito à beringela (Kantharajah e Golegaonkar, 2004), existindo muita bibliografia díspar.

Ao longo das subculturas de massas celulares efetuadas, em meio fresco de indução, foi possível verificar que o calo obtido tem a capacidade de formação de plantas. No decorrer das subculturas, foi possível constatar uma diminuição sucessiva do número de novas estruturas. Podem ser efetuadas subculturas embriogénicas de algumas espécies, e de alguns genótipos, durante longos períodos de tempo em meio com reguladores de crescimento e ainda assim reter o potencial embriogénico; no entanto, na maior parte dos casos, o potencial embriogénico decresce com culturas prolongadas e eventualmente perde-se (Yang e Zhang, 2010). Apesar destas subculturas terem sido efetuadas em meio sem reguladores de crescimento, a perda de potencial é uma das possíveis justificações para os resultados obtidos. Curiosamente, verificou-se que do mesmo calo onde inicialmente desenvolveram embriões somáticos, se diferenciaram rebentos em subculturas. Nos ensaios de Fári *et al.* (1995b) com cotilédones, em meio de indução com 4 mg/l de 2,4-D, ocorreu a formação simultânea de embriões somáticos e rebentos, justificando os resultados obtidos. Com base no constante decréscimo de diferenciação

DISCUSSÃO

de novos rebentos, poderá considerar-se o facto deste processo ser o seguimento de uma via organogénica por parte das massas celulares, visto que nas subculturas de calo não ocorria a diferenciação de embriões somáticos. Estes últimos resultados poderão refletir, não um processo de ES mas sim de organogénese, dado que os rebentos surgem a partir das massas celulares colocadas em cultura.

No que diz respeito à conversão dos embriões somáticos obtidos diretamente a partir dos explantes sujeitos à indução de ES, o meio que apresentou maior número de plântulas desenvolvidas foi o TN10. Todavia, o que originou mais plantas normais foi o TN4, concluindo-se que este é efetivamente o meio mais eficiente em todas as etapas.

A formação de rebentos sem desenvolvimento concomitante de raiz foi elevada, no entanto raízes adventícias eram por vezes formadas na base destes rebentos, permitindo a regeneração. Não obstante, a conversão de embriões somáticos em plantas encontra-se normalmente limitada devido a anomalias tais como vitrificação, ausência de meristema apical, fusão de cotilédones e maturação ineficiente, embora as taxas de conversão possam ser elevadas (Magioli e Mansur, 2005). Para além das anomalias registadas, alguns dos rebentos colocados em cultura desdiferenciaram parcial ou totalmente. Observações semelhantes foram feitas por Saito e Nishimura (1994). Outro aspeto comum foi o aparecimento de calo na base de rebentos caulinares. No caso das plantas, foi possível demonstrar que estas apresentavam capacidade de serem micropropagadas normalmente sem posterior desenvolvimento de calo. Em relação aos rebentos, foi registado um contínuo desenvolvimento de calo (diferente da desdiferenciação acima mencionada), que impedia a formação/desenvolvimento do meristema radicular. Os rebentos possuíam zonas meristemáticas apicais caulinares ativas que demonstraram desenvolver normalmente, embora existisse uma interrupção do crescimento da raiz, dando-se a inativação da zona meristemática radicular. Estes dados poderão ir de encontro ao referido anteriormente, suscitando a dúvida relativamente à origem embriogénica dos rebentos; surge novamente a probabilidade de considerar estes rebentos consequência de um processo organogénico, iniciado aquando das subculturas de calo. Apesar de todas as características irregulares registadas durante este processo, plantas aclimatadas de beringela desenvolveram normalmente chegando a atingir o estágio de frutificação.

4.3.2. Tamarilho

Quando massas de calo embriogénico de tamarilho (80 a 100 mg), originadas a partir de folhas, embriões somáticos ou entrenós, são transferidas para meio de cultura, com reduzidos níveis de sacarose e sem reguladores de crescimento, as massas embriogénicas tendem a organizar-se e desenvolvem para embriões somáticos morfológicamente idênticos aos obtidos através de ES *one-step* (Canhoto *et al.*, 2005). Neste ensaio foi testada a capacidade embriogénica do calo obtido. Verificou-se que o desenvolvimento embrionário não foi sincronizado, sendo encontradas diferentes fases no mesmo calo, tal como ocorreu em Correia *et al.* (2011). Tal como no desenvolvimento de embriões somáticos de beringela, foram observados fenótipos anómalos que posteriormente germinaram normalmente. 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), embora 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 a uma fraca capacidade na acumulação de substâncias de reserva durante a maturação, conduzindo a impactos negativos no desenvolvimento embrionário. Apesar de tudo, o calo embriogénico de tamarilho tem uma grande capacidade embriogénica, sendo que cada grama de peso fresco de calo poderá diferenciar cerca de 111 novas plantas (Correia *et al.*, 2011).

Durante o desenvolvimento foi possível observar uma estrutura semelhante a uma bainha, tal como na beringela, a rodear a zona apical parecendo o local de germinação. O mesmo foi registado em estudos prévios com o tamarilho (Correia *et al.*, 2011). Seria interessante uma análise detalhada do papel desta estrutura em estudos futuros.

As plantas de tamarilho desenvolveram normalmente, chegando à aclimação, onde continuaram o seu desenvolvimento.

4.4. Análise dos níveis de expressão da *NEP-TC* nos tecidos induzidos das solanáceas e indução de ES em linhas de *Arabidopsis thaliana knockout* para genes da família das SpoU metiltransferases de RNA

No presente trabalho foi avaliada a expressão de uma proteína (*Non-Embryogenic Protein from Tamarillo Callus*, GenBank JQ766254) previamente identificada, isolada e sequenciada a partir de calo não embriogênico de tamarilho (Faro *et al.*, 2003). Para avaliar o papel desta proteína durante o processo embriogênico, foi também testado se o processo de indução de ES era afetado nas linhas *knockout* de *Arabidopsis* para o cDNA identificado.

Analisando os resultados obtidos, através de RT-PCR, dos tecidos de tamarilho antes (folhas) e após (CE, CNE) serem sujeitos ao processo de indução de ES, foi possível concluir que, ao contrário do que foi descrito anteriormente, a presença de *NEP-TC* não é exclusiva do calo não embriogênico, sendo que os seus transcritos foram identificados em todos os tecidos testados. O mesmo foi obtido nos trabalhos de Correia (2011), onde a expressão deste gene foi detetada nos tecidos não induzidos e nos dois tipos de calo. No entanto, o que se verificou nas análises efetuadas, foi um aumento de expressão nos tecidos induzidos, sendo que para CNE a expressão é maior relativamente a CE. Portanto, apesar do gene ser expresso em todos os tecidos, continua a existir uma concordância no que diz respeito à possibilidade deste ser associado à inibição da ES.

Neste ensaio foi possível concluir que os *primers* desenhados para o tamarilho são específicos também para pera-melão e beringela e que a expressão de *NEP-TC* e seus homólogos é mais elevada que o gene controlo *EFl α* . Nas restantes solanáceas, registou-se o mesmo verificado para o tamarilho, onde os tecidos não induzidos (folhas) apresentam uma expressão mais reduzida que os tecidos induzidos. No entanto, foi encontrada uma inconstância, visto que nos tecidos de beringela os níveis de expressão são elevados para todos os tecidos, e o calo embriogênico apresenta níveis mais altos do que o calo não embriogênico; sugerindo que nesta solanácea o homólogo de *NEP-TC* não terá a mesma função proposta para os tecidos de tamarilho, ou que o material embriogênico analisado apresentava uma grande quantidade de células não embriogênicas misturadas, que poderiam ter alterado os resultados face ao esperado.

Também uma elevada similaridade entre a sequência de aminoácidos da *NEP-TC* e uma metiltransferase tRNA/rRNA de *Arabidopsis* levou à consideração da análise nestas linhas *knockout* para o gene *AT4G15520* (KO7), o gene homólogo da *NEP-TC*, e

também de outra linha, da mesma família das metiltransferases, *knockout* para o gene *AT5G15390* (MT5). Os ensaios de indução de ES nestas linhas não demonstraram diferenças significativas entre as linhas KO e WT. No entanto, a linha KO7 apresentou uma taxa de indução mais elevada comparativamente com MT5 e WT, o que vai de encontro aos resultados obtidos por Correia (2011), mostrando alguma relevância relativamente ao silenciamento total do gene em estudo. É natural o facto de, nestas linhas serem registadas algumas diferenças, ainda que diminutas, comparativamente com as linhas de tamarilho mutantes obtidas por Correia (2011). Enquanto que as últimas apresentam uma expressão do gene *NEP-TC* reduzida, KO7 apresenta o silenciamento total do gene. Foi obtida uma linha de tamarilho com a expressão genética de *NEP-TC down-regulated*, no entanto neste estudo não foram verificadas diferenças na indução de ES comparativamente com as plantas controlo (Correia, 2011).

O mecanismo pelo qual esta proteína debilita o sistema de ES é ainda desconhecido, sendo que futuras análises deverão ser feitas. É importante compreender como é que o desenvolvimento dos embriões é influenciado pelos diferentes tratamentos providenciados durante a fase *in vitro*, e os mecanismos que controlam a diferenciação celular durante a embriogénese somática ainda não são claros (von Arnold *et al.*, 2002). No entanto, estando a NEP-TC possivelmente associada com potencial embriogénico poderá contribuir futuramente para a compreensão de vários aspetos relacionados com a origem embriogénica.

4.4.1. Observação do desenvolvimento morfológico

Os dados morfológicos recolhidos durante o desenvolvimento das linhas *knockout* e *wild type* de *Arabidopsis* tiveram como objetivo perceber se as mutações inseridas em MT5 e KO7 apresentavam alguma alteração fenotípica relativamente a WT. Durante os ensaios não foram detetadas muitas diferenças no que diz respeito à análise do ciclo de vida da planta, com exceção do tempo de desenvolvimento da inflorescência e um menor desenvolvimento da roseta na linha MT5, o que pode demonstrar uma maior rapidez na transição da fase vegetativa para a fase reprodutiva em plantas cuja função desta metiltransferase de RNA está alterada. Além disso, as diferenças significativas registadas entre o comprimento das raízes primárias e o número de raízes secundárias sugerem diferenças fenotípicas entre as linhas testadas. Ainda que não se tenha feito uma análise

DISCUSSÃO

quantitativa da presença de pelos radiculares, é visualmente evidente que as linhas *knockout* apresentam uma quantidade muito mais elevada relativamente às *wild type*. Os resultados obtidos sugerem que estas linhas poderão ter modificações no desenvolvimento do sistema radicular. Sendo a formação de pelos radiculares um tipo de desenvolvimento estimulado pelo etileno (Taiz e Zeiger, 2010), e estando a produção de etileno sob controlo das auxinas, pode especular-se que as linhas *knockout* apresentam modificações no metabolismo os nos mecanismos de interação destas hormonas. No entanto, esta hipótese necessita de ser suportada por dados experimentais.

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS



O conjunto de resultados obtido permitiu estabelecer o paralelismo entre os sistemas de indução de ES em duas solanáceas com interesse económico e biotecnológico. Foi possível reconhecer características chave de ambos os sistemas de indução de ES que possivelmente terão potencialidade para contribuírem como sistemas modelo alternativos. Futuros ensaios deverão ser efetuados, de forma a otimizar o protocolo de indução na beringela e também os aspetos relacionados com a maturação e o desenvolvimento dos embriões somáticos, dado o grande número de irregularidades no decurso deste processo. Também o facto de terem sido testadas várias condições de indução para a pera-melão contribuiu para o conhecimento científico de mais uma solanácea cujo potencial morfogénico é ainda desconhecido.

O reconhecimento da expressão de genes homólogos a *NEP-TC* noutras solanáceas, que não o tamarilho, deixa em aberto a possibilidade de estabelecer uma ligação entre a compreensão dos processos de morfogénese, como a ES e o desenvolvimento do sistema radicular, e a regulação genética implicada nestes sistemas. Estes dados revelam que a presença deste gene não é restrita ao tamarilho, e a presença dos seus homólogos noutras espécies auxiliará futuros ensaios que se realizem no sentido de compreender melhor a função de *NEP-TC*. Os resultados obtidos nas linhas *knockout* de *Arabidopsis* também apresentam dados interessantes, demonstrando que o silenciamento total do homólogo de *NEP-TC* aumenta ligeiramente os níveis de obtenção de embriões somáticos, indicando que este gene poderá estar realmente interligado com o processo de indução de ES. Para além disto, as linhas *knockout* revelam características fenotípicas particulares que deverão ser exploradas no futuro de forma a esclarecer novas informações acerca da expressão genética durante o desenvolvimento fenotípico destas linhas mutantes.

6. REFERÊNCIAS



- Ali M**, Okubo H, Fujieda K (1991) *In vitro* multiplication of intra and interspecific *Solanum* hybrids through somatic embryogenesis and adventitious organogenesis. J. Jpn. Soc. Hortic. Sci. 60: 601-612.
- Alicchio R**, Del Grosso E, Boschieri E (1982) Tissue cultures and plant regeneration from different explants in six cultivars of *Solanum melongena*. Experientia 38: 449-450.
- Alonso JM**, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseeuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. Science 301: 653-657.
- Arabidopsis Genome Initiative** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. Nature 408: 796-815.
- Naser A** (1984) Multiplication *in vitro* del pepino dulce (*Solanum muricatum* Ait.). Tese de Mestrado, Universidad Catolica Valparaiso, Chile.
- Arao T**, Takeda H, Nishihara E (2008) Reduction of cadmium translocation from roots to shoots in eggplant (*Solanum melongena*) by grafting onto *Solanum torvum* rootstock. Soil Sci Plant Nutr 54: 555-559.
- 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.
- Bermejo JEH**, León J (1994) Neglected Crops: 1492 from a different perspective. FAO Plant Production and Protection Series, no.26. Rome.

- Bhatia P**, Ashwath N, Senaratna T, Midmore D (2004) Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 78: 1-21.
- Bohs L** (1989) Ethnobotany of the genus *Cyphomandra* (Solanaceae). *Econ Bot* 43: 143-163.
- Bohs L** (1995) Transfer of *Cyphomandra* (Solanaceae) and its species to *Solanum*. *Taxon* 44: 583-587.
- Bonga JM**, Klimaszewska KK, Aderkas P (2010) Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 100: 241-254.
- Boyes DC**, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Görlach J (2001) Growth stage-Based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* 13: 1499-1510.
- Canhoto JM** (2010) Biotecnologia vegetal da clonagem de plantas à transformação genética. Imprensa da Universidade de Coimbra. Coimbra.
- Canhoto JM**, Lopes ML, Cruz GS (2005) Protocol of somatic embryogenesis: tamarillo (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn.). Em: SM Jain, PK Gupta (Eds.) Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody plants, Dordrecht, Springer. pp. 379-389.
- Canhoto JM**, Lopes ML, Cruz GS (1999) Somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle (Myrtaceae). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 57: 13-21.
- Cavusoglu A**, Sulusoglu M (2013) *In vitro* propagation and acclimatization of pepino (*Solanum muricatum*). *J Food Agric Environ* 11: 410-415.
- Chawla HS** (2010) Introduction to plant biotechnology (3^a Ed). Science Publishers, Inc Enfield, NH, USA.

- Cohen D, Elliot D (1979)** Micropropagation methods for blueberries and tamarillos. Comb Proc Int Plant Prop Soc 29: 177-179.
- Collonnier C, Fock I, Kashyap V, Rotino GL, Daunay MC, Lian Y, Mariska IK, Rajam MV, Servaes A, Ducreux G, Sihachakr D (2001)** Applications of biotechnology in eggplant. Plant Cell Tiss Organ Cult 65: 91-107.
- Cornejo P, Nuez F, Esteban MJ (1990)** Obtencion *in vitro* de plantulas de pepino dulce a partir de semillas. Actas Congr Iberico Cienc Horti 4-1: 312-316
- Corral-Martínez P, Seguí-Simarro JM (2012)** Efficient production of callus-derived double haploids through isolated microspore culture in eggplant (*Solanum melongena* L.). Euphytica 187: 47-61.
- 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 betacea* (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, Canhoto J (2009)** Somatic embryogenesis induction is promoted in knocked-out lines of *Arabidopsis thaliana* for a cDNA identified in non-embryogenic calluses of tamarillo (*Cyphomandra betacea*). New Biotechnol 25: S300-S301.
- Correia SI, Canhoto JM (2012)** Biotechnology of tamarillo (*Cyphomandra betacea*): From in vitro cloning to genetic transformation. Sci Horti 148: 161-168.

- Correia SI, Cunha AE, Salgueiro L, Canhoto JM (2012)** Somatic embryogenesis in tamarillo (*Cyphomandra betacea*): approaches to increase efficiency of embryo formation and plant development. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 109:143-152.
- 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 (2009)** Somatic embryogenesis in tamarillo (*Cyphomandra betacea*): recent advances. *Acta Hort.* 839: 157-164.
- Doganlar S, Frary A, Daunay MC, Lester RN, Tanksley SD (2002a)** A comparative genetic linkage map of eggplant (*Solanum melongena*) and its implications for genome evolution in the Solanaceae. *Genetics Society of America* 161: 1697-1711
- Doganlar S, Frary A, Daunay MC, Lester RN, Tanksley SD (2002b)** Conservation of gene function in the Solanaceae as revealed by comparative mapping of domestication traits in eggplant. *Genetics Society of America* 161: 1713-1726
- Ercan N, Akilli M (1996)** Reasons for parthenocarpy and the effects of various hormone treatments on fruit set in pepino (*Solanum muricatum* Ait.). *Sci Hortic* 66: 141-147.
- Fári M, Csanyi M, Mityko J, Peredi A, Szasz A, Csillag A (1995a)** An alternative pathway of in vitro organogenesis in higher plants: plant regeneration via decapitated hypocotyls in three solanaceous vegetables genera. *Hort. Sci.* 27: 9-16.
- Fári M, Nagy I, Csányi M, Mitykó J, Andrásfalvy A (1995b)** *Agrobacterium* mediated genetic transformation and plant regeneration via organogenesis and somatic embryogenesis from cotyledon leaves in eggplant (*Solanum melongena* L. cv. 'Kecskeméti lila'). *Plant Cell Rep* 15: 82-86.
- Fassuliotis G, Nelson BV e Bhatt DP (1981)** Organogenesis in tissue culture of *Solanum melongena* cv. Florida Market. *Plant Sci Lett* 22: 119-125.

- Faro MR**, Lopes ML, Canhoto JM, Cheung A, Cruz GS (2003) Identification and molecular characterization of a non-embryogenic *calli* protein in *Cyphomandra betacea*. 7th Int Bot Meeting – Plant Cell Biology. Lisboa, Portugal.
- Fehér A**, Pasternak TP, Dudits D (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 74: 201-228.
- Ferreira ML**, Lopes ML, Veríssimo PC, Canhoto JM, Cruz GS (1998) Somatic embryogenesis in leaves of *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.: histological and biochemical studies. Abst IX International Cong on Plant Tissue Cell Culture, Jerusalem, Israel.
- Figueroa F**, Avalos R, Vargas V (2006) Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 86: 285-301.
- Fobert PR e Webb DT** (1988) Effects of polyamines, polyamine precursors, and polyamine biosynthetic inhibitors on somatic embryogenesis from eggplant (*Solanum melongena*) cotyledons. *Can J Bot* 66: 1734-1742.
- Gamborg O**, Miller R, Ojima K (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50: 151-158.
- Gleddie SC** (1986) Plant regeneration and somatic hybridization in the genus *Solanum*. Dissertation Abst. Int. B 47 (5), 1825b.
- Gleddie S**, Keller WA, Setterfield G (1983) Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants and cell suspensions of *Solanum melongena* (Eggplant). *Can J Bot* 61: 656-666.
- Gleddie S**, Keller WA, Setterfield G (1986) Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension derived protoplasts of *Solanum melongena* (eggplant). *Can J Bot* 64: 355-361.

- Guimarães** MLS, Cruz S, Montezuma-de-Carvalho JM (1988) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. Plant Cell Tiss Organ Cult 15: 161-167.
- Guimarães** M, Tomé M, Cruz G (1996) *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (Tamarillo). Em: Bajaj YPS (Ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Trees IV. Springer-Verlag. Berlin. pp. 120-137.
- Gunn** CR, Gaffney FB (1974) Seed characteristics of 42 economically important species of Solanaceae in the United States. U.S. Dept. of Agriculture. Washington.
- Haccius** B, Lakshmanan KK (1965) Adventiv-embryonen aus Nicotiana-Kallus der bei hohen lichtintensitäten kultiviert wurde. Planta 65: 102-104.
- Hansen** J, Møller I (1975) Percolation of starch and soluble carbohydrates from plant tissue for quantitative determination with anthrone. Anal Biochem 68: 87-94.
- Hanyu** H, Murata A, Park EY, Okabe M, Billings S, Jelenkovic G, Pedersen H, Chin C-K (1999) Stability of luciferase gene expression in a long term period in transgenic eggplant, *Solanum melongena*. Plant Biotechnol 16: 403-407.
- Hitomi** A, Amagai H, Ezura H (1998) The influence of auxin type on the array of somaclonal variants generated from somatic embryogenesis of eggplant, *Solanum melongena* L. Plant Breeding 117: 379-383.
- Hussain** S, Rao A, Husnain T, Riazuddin S (2009) Cotton somatic embryo morphology affects its conversion to plant. Biol Plantarum 53: 307-311.
- Ikeda-Iwai** M, Satoh S, Kamada H (2002) Establishment of a reproducible tissue culture system for the induction of *Arabidopsis* somatic embryos. J Exp Bot 53: 1575-1580.
- Isouard** G, Raquin C, Demarly Y (1979) Obtention de plantes haploïdes et diploïdes par culture *in vitro* d'anthères d'aubergine (*Solanum melongena* L.). Comptes Rendus de l'Académie de Sciences de Paris 288: 987-989.

- Jiménez V** (2005) Involvement of plant hormones and plant growth regulators in *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regul* 47: 91-110.
- Joo MK, Kim TS, Cho CY** (1986) Plant regeneration from leaf explants of the tropical fruit vegetable pepino (*Solanum muricatum* Ait.). *Korean Journal of Plant Tissue Culture* 13: 143-148.
- Jordan M, Arce P, Gutiérrez A, Roveraro C** (1990a). Inducción de respuestas morfogénicas *in vitro* mediante co-cultivo de diferentes especies frutales. *Cienc Investigación Agraria* 17: 13-17.
- Jordan M, Arce P, Gutiérrez A, Roveraro C** (1990b) Micropropagación *in vitro* de algunas especies frutícolas de Chile. *Cienc Investigación Agraria* 17: 111-116.
- Jordán M, Botti C** (1992) Tropical and subtropical small fruits. Em: Hammerschlag FA, Litz RE (Ed.) *Biotechnology of perennial fruit crops*. Oxford University Press, USA. pp. 513-531.
- Jordan M, Obando M, Iturriaga L, Goreux A, Velozo J** (1993) Organogenesis and regeneration of some Andean fruit species. *Acta Hort* 336: 279-284.
- Kamat MG, Rao NA** (1978) Vegetative multiplication of eggplants (*Solanum melongena*) using tissue culture techniques. *Plant Sci Lett* 13: 57-65.
- Kantharajah AS, Golegaonkar PG** (2004) Somatic embryogenesis in eggplant. *Sci Hort* 99: 107-117.
- Kashyap V, Kumar SV, Collonnier C, Fusari F, Haicour R, Rotino GL, Sihachakr D, Rajam MV** (2003) *Biotechnology of eggplant*. *Sci Hort* 97: 1-25.

- Khah EM** (2005) Effect of grafting on growth, performance and yield of aubergine (*Solanum melongena* L.) in the field and greenhouse. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 3: 92-94.
- Knapp S** (2002) Tobacco to tomatoes: a phylogenetic perspective on fruit diversity in the Solanaceae. *J Exp Bot* 53: 2001-2022.
- Knapp S, Bohs L, Nee M, Spooner DM** (2004) Solanaceae – a model for linking genomics with biodiversity. *Comp Funct Genom* 5: 285-291.
- Koornneef M, Meinke D** (2010) The development of *Arabidopsis* as a model plant. *Plant J* 61: 909-921
- Lopes ML, Ferreira MR, Carloto JM, Cruz GS, Canhoto JM** (2000) Somatic embryogenesis induction in tamarillo (*Cyphomandra betacea*). Em: 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. Em: Loyola-Vargas VM, Vázquez-Flota F (Eds) *Plant Cell Culture Protocols Second Edition*. Totowa, New Jersey. Humana Press. pp 3-8.
- Magioli C, Mansur E** (2005) Eggplant (*Solanum melongena* L.): tissue culture, genetic transformation and use as an alternative model plant. *Acta Bot Bras* 19: 139-148.
- Magioli C, Rocha, APM, Oliveira DE, Mansur E** (1998) Efficient shoot organogenesis of eggplant (*Solanum melongena* L.) induced by thidiazuron. *Plant Cell Rep* 17: 661-663.
- Mariani P** (1992) Eggplant somatic embryogenesis combined with synthetic seed technology. *Proc Meet Genet Breed Capsicum Eggplant* 8: 289-294.
- Matsuoka H.** (1983) Factors affecting embryoid formation in hypocotyl callus of *Solanum melongena* L. *Jpn J Breed* 33: 303-309.

- McCane J, Widdowson DA** (1992) Em: Fruit and nut Suppl. To the composition of foods.) 5th Ed. London, Holland, Unwin & Buss. pp. 74-77.
- Meadows LR** (2002) Growing tamarillo relatives. Em: The New Zealand Home Garden.
- Miyoshi K** (1996) Callus induction and plantlet formation through culture of isolated microspores of eggplant (*Solanum melongena* L.). Plant Cell Rep 15: 391-395.
- Morton JF** (1987) Tree tomato. Em: 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.
- Mueller LA, Solow TH, Taylor N, Skwarecki B, Buels R, Binns J, Lin C, Wright MH, Ahrens R, Wang Y, Herbst EV, Keyder ER, Menda N, Zamir D, Tanksley SD** (2005) The SOL Genomics Network. A Comparative Resource for Solanaceae Biology and Beyond. Plant Physiol 138: 1310-1317.
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Plant Physiol 15: 473-497.
- Murray MG, Thompson WF** (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucl Acid Res 8: 4321-4325.
- Nicot N, Hausman JF, Hoffmann L, Evers D** (2005) Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. J Exp Bot 56: 2907-2914.
- Nemati SH, Karimian Z, Tehranifar A, Mashhadian NV, Lakzian A** (2009) Investigation of some effective factors on yield traits of pepino (*Solanum muricatum*) as a new vegetable in Iran. Pak J Biol Sci 12: 492-497.

REFERÊNCIAS

- Nuez F, Ruiz JJ (1996)** El pepino dulce y su cultivo. Estudio FAO Produccion y Proteccion Vegetal. Roma.
- Obando M, Goreux A, Jordan M (1992)** Regeneration *in vitro* de *Cyphomandra betacea* (tamarillo), una especie frutal andina. Cienc e Investigacion Agraria 19: 125-130.
- Obando M, Jordan M (2001)** Regenerative responses of *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (tamarillo) cultivated *in vitro*. Acta Hort (ISHS) 560: 429-432.
- Pauli R (1988)** Micropropagation of pepinos (*Solanum muricatum* Ait). Acta Hort. 227: 387-389.
- Picoli EAT, Otoni WC, Figueira ML, Carolino SMB, Almeida RS, Silva EAM, Carvalho CR, Fontes EPB (2001)** Hyperhydricity in *in vitro* eggplant regenerated plants: structural characteristics and involvement of BiP (Binding Protein). Plant Sci 160(5): 857-868.
- Pierik RLM (1997)** Micropropagation of *Solanum muricatum* Ait. (Pepino). Em: Bajaj YPS (Ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 39 High-Tech and Micropropagation V. Springer. Berlin, Heidelberg. pp. 160-171.
- Pierik RLM, Oostveen BCM, Silfhout AM van, Sprenkels PA (1993)** Micropropagation of pepino. Prophyta 47: 22-23.
- Prohens J, Anderson GJ, Rodríguez-Burruezo A, Heiser CB, Nuez F (2004)** Descriptors for pepino (*Solanum muricatum*). IPGRI. Rome.
- Prohens J, Nuez F (2001)** The tamarillo (*Cyphomandra betacea*): a review of a promising small fruit crop. Small Fruits Review 1: 43-68.
- Prohens J, Ruiz JJ, Nuez F (2000)** Growing Cycles for a New Crop, the Pepino, in the Spanish Mediterranean. Acta Hort. 523: 53-60.

- Prohens J, Ruiz JJ, Nuez F (1996)** The Pepino (*Solanum muricatum*, Solanaceae): A “New” Crop with a History. *Econ Bot* 50: 355-368.
- Rajam MV, Kumar SV (2007)** Eggplant. Em: Pusa EC, Davey MR (eds) *Biotechnology in agriculture and forestry, transgenic crops IV*. Springer, Berlin. pp 201-219.
- Rao PVL, Singh B (1991)** Plantlet regeneration from encapsulated somatic embryos of hybrid *Solanum melongena* L. *Plant Cell Rep* 10: 7-11.
- Rodríguez-Burruezo A, Prohens J, Fita AM (2011)** Breeding strategies for improving the performance and fruit quality of the pepino (*Solanum muricatum*): A model for the enhancement of underutilized exotic fruits. *Food Res Int* 44: 1927-1935.
- Rotino GL, Falavigna A, Fiume F, Nervo G, Restaino F (1987)** Possibility of eggplant (*Solanum melongena* L.) improvement through in vitro techniques. *Genet Agraria* 41: 314-315.
- Saito T, Nishimura S (1994)** Improved culture conditions for somatic embryogenesis using an aseptic ventilative filter in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Plant Sci* 102: 205-211.
- Sakamoto K, Taguchi T (1991)** Regeneration of intergeneric somatic hybrid plants between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum muricatum*. *Theor Appl Genet* 81: 509-513.
- Sakamoto K, Taguchi T (1994)** Somatic hybridization between tomato (*Lycopersicon esculentum*) and pepino (*Solanum muricatum*). Em: Bajaj YPS (Ed.) *Biotechnology in agriculture and forestry, vol 27. Somatic hybridization in crop improvement I*. Springer, Berlin Heidelberg New York. pp. 244–254.
- Särkinen T, Bohs L, Olmstead RG, Knapp S (2013)** A phylogenetic framework for evolutionary study of the nightshades (Solanaceae): a dated 1000-tip tree. *BMC Evol Biol* 2013 13:214

- Scoccianti V**, Sgarbi E, Fraternali D, Biondi S (2000) Organogenesis from *Solanum melongena* L. (eggplant) cotyledon explants is associated with hormone-modulated enhancement of polyamine biosynthesis and conjugation. *Protoplasma* 211: 51-63.
- Sharma S e Millam S** (2004) Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L.: a histological examination of key developmental stages. *Plant Cell Rep* 23: 115-119
- Sharma P e Rajam MV** (1995a) Genotype, explant and position effects on organogenesis and embryogenesis in eggplant (*Solanum melongena*). *J Exp Bot* 46: 13-141.
- Sharma P, Rajam MV** (1995b) Spatial and temporal changes in endogenous polyamine levels associated with somatic embryogenesis from different hypocotyl segments of eggplant (*Solanum melongena* L.). *J Plant Physiol* 146: 658-664.
- Seguí-Simarro JM, Corral-Martínez P, Parra-Veja V, González-García B** (2011) Androgenesis in recalcitrant solanaceous crops. *Plant Cell Rep* 30: 765-778.
- Sidhu MK, Dhatt AS, Sidhu GS** (2014) Plant Regeneration in eggplant (*Solanum melongena* L.): A review. *Afr J Biotechnol* 13: 714-722.
- Sihachakr D, Chaput MH, Serraf I, Ducreux G** (1993) Regeneration of plants from protoplasts of eggplant (*Solanum melongena* L.). Em: Bajaj YPS (Ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Plant Protoplasts and Genetic Engineering, Vol IV*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 108-122.
- Stasolla C, Yeung EC** (2003) Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 74: 15-35.
- Stepanova AN, Alonso JM** (2003) T-DNA mutagenesis in Arabidopsis. Em: E Grotewold (Ed.) *Plant Functional Genomics*, Totowa, NJ: Humana Press. pp. 177-188.
- Szyndel MS, Kowalczyk K, Pawelczak A** (2008) Elimination of *Tomato Mosaic Virus* (ToMV) from Pepino (*Solanum muricatum*) *Plants Phytopathol Pol.* 49: 57-63.

- Taiz L, Zeiger E** (2010) Plant physiology. 5th ed. Sunderland: Sinauer Associates.
- Tamarillo Growers Association** (2005) The nutritional composition and health benefits of New Zealand tamarillos. Crop & Food Research Confidential Report No. 1281. New Zealand Institute for Crop & Food Research Limited.
- The Tomato Genome Consortium** (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*. 485: 635-641.
- Thorpe TA, Stasolla C** (2001) Somatic embryogenesis. Em: Bhojwani SS, Soh WY (Eds.) *Current Trends in the Embryology of Angiosperms*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 279-336.
- von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J, Filonova L** (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 69: 233-249.
- Yadav JS e Rajam MV** (1997) Spatial distribution of free and conjugated polyamines in leaves of *Solanum melongena* L. associated with differential morphogenetic capacity: efficient somatic embryogenesis with putrescine. *J Exp Bot* 48: 1537-1545.
- Yadav JS e Rajam MV** (1998) Temporal regulation of somatic embryogenesis by adjusting cellular polyamine content in eggplant. *Plant Physiol* 116: 617-625.
- Yamada T, Nakagawa H, Sinoto Y** (1967) Studies on the differentiation in cultured cells. I. Embryogenesis in three strains of *Solanum* callus. *Bot Mag Tokyo* 80: 68-74.
- Yang X, Zhang X** (2010) Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Crit Rev Plant Sci* 29: 36-57.

REFERÊNCIAS

Zavattieri MA, Frederico AM, Lima M, Sabino R, Arnholdt-Schmitt B (2010) Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. *Electron J Biotechnol* vol.13. <http://www.ejbiotechnology.cl/content/vol13/issue1/full/4/index.html>, acedido em Julho de 2014.

Zelcer A, Soferman O, Izhar S (1983) Shoot regeneration in root cultures of Solanaceae. *Plant Cell Rep.* 2: 252-254.

Zimmerman JL (1993) Somatic embryogenesis: a model of early development in higher plants. *Plant Cell* 5: 1411-1423.

eFP Browser, <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi/>, acedido em Julho de 2014.

FAOSTAT (2014) <http://faostat3.fao.org/>, acedido em Abril de 2014.

<http://eol.org/>, acedido em Abril de 2014.

<http://Prota4u.org/>, acedido em Abril de 2014.

<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>, acedido em Junho de 2014

<http://solanaceaesource.org/>, acedido em Abril de 2014.

<http://solgenomics.net/>, acedido em Abril de 2014.

<http://solgenomics.net/solanaceae-project>, acedido em Abril de 2014.