

Universidade de Coimbra  
Faculdade de Ciências e Tecnologia



**Departamento de Ciências da Vida**

**Análise de substâncias de reserva em embriões  
zigóticos e somáticos de feijoa e de tamarilho  
- otimização da embriogénese somática**

Mestrado em Biologia

Ana Estefânia da Cunha Correia

2010



**Departamento de Ciências da Vida**

**Análise de substâncias de reserva em embriões  
zigóticos e somáticos de feijoa e de tamarilho  
- otimização da embriogénese somática**

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários obtenção do grau de Mestre em Biologia, área de especialização de Biotecnologia Vegetal, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Jorge Manuel Pataca Leal Canhoto e co-orientação da Professora Doutora Lígia Maria Ribeiro Pires Salgueiro

Ana Estefânia da Cunha Correia

*À minha querida avó,  
Maria José Fortunato da Cunha*

---

---

## AGRADECIMENTOS

---

---

Gostaria de salientar o apoio de diversas pessoas que tornaram possível a realização deste trabalho e às quais gostaria de manifestar os meus sinceros agradecimentos.

Ao Professor Doutor Jorge Canhoto, pela orientação desta dissertação, pela disponibilidade, empenho, compreensão e simpatia constantes com que me acompanhou e apoiou durante a realização deste trabalho. Um agradecimento especial pelas oportunidades que me proporcionou e pela confiança, pela paciência e amizade demonstradas.

À Dr.<sup>a</sup> Ludovina Lopes pelo acompanhamento, pelos ensinamentos e pela colaboração imprescindível nas várias técnicas laboratoriais. Um agradecimento muito especial pela amizade, pelos mimos, pela energia...

Ao Professor Doutor Gil Cruz pela imensa simpatia e disponibilidade, quer na resolução de dúvidas, quer nos momentos de convívio proporcionados.

À Professora Doutora Lígia Salgueiro e à Dr.<sup>a</sup> Teresa Amaral pelos ensinamentos e disponibilidade que demonstraram ao longo da realização deste trabalho, em especial na quantificação de lípidos.

Ao Dr. José Santos Dias pela disponibilidade demonstrada e pelos ensinamentos que me prestou durante a preparação das amostras de microscopia.

À Sr.<sup>a</sup> D. Eulália Rosa pelo auxílio incondicional no cuidado do material de laboratório, na elaboração dos meios de cultura e em tudo o que necessitei ao longo da realização deste trabalho. Um agradecimento muito especial por toda a atenção e carinho, pela amizade, pelo convívio, pela força...

A todos os funcionários do Departamento de Botânica que, de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho, em especial à Sr.<sup>a</sup> D. Isabel Corino.

À Sandra Correia pelos ensinamentos e pela colaboração neste trabalho. Pela paciência, pela calma, pela amizade...

Aos meus pais, Ana Paula e Francisco, antes de mais pela educação e princípios que me inculcaram. Um agradecimento muito especial pela força e energia, via telemóvel, que me transmitiram e transmitem todos os dias. Pelo amor...

À minha querida irmã, Francisca Cunha, pela alegria da vida...

Ao Ricardo S.P., por me acompanhar na aventura de viver...

Aos meus amigos...

---

---

**ABREVIATURAS**

---

---

ABA- ácido abscísico	ml – mililitro
atm. - atmosfera	mm – milímetro
BSA- albumina bovina do soro	MS – Murashige & Skoog
C.E. – Calo Embriogénico	m/v – massa por volume
CEDI – células embriogénicas determinadas por indução	NAA – ácido $\alpha$ -naftaleno acético
cm - centímetro	nm – nanómetro
CEPD – células embriogénicas pré- determinadas	Nº ou nº - número
em desv. – em desenvolvimento	PAS – periodic acid Shiff
ES ou es – embrião somático	p/v – peso por volume
EST. – estampa	rpm – rotações por minuto
EZ ou ez – embrião zigótico	S ou s – semente
Fig. – figura	SC ou sc – semente cortada
F.p. – fotoperíodo	SDS – dodecil sulfato de sódio
g – grama	s/ desv. – sem desenvolvimento
g/L – grama por Litro	Tab. – tabela
GA3 – ácido giberélico	TIBA – ácido 2,3,5-triidobenzóico
h – hora	v/v – volume por volume
HCl – ácido clorídrico	2,4-D – ácido 2,4-diclorofenoxiacético
IAA – ácido-3-indolacético	°C – grau célsius
IBA – ácido indol-3-butírico	$\mu$ g/ml – micrograma por mililitro
KOH – hidróxido de potássio	$\mu$ L – microlitro
L – Litro	$\mu$ m – micrómetro
m – metro	
M – molar	
M.G. – meio de germinação	
mg – miligrama	
mg/ml – miligrama por mililitro	
mg/L – miligrama por Litro	
min. - minuto	

---

---

**RESUMO**

---

---

A feijoa e o tamarilho são espécies fruteiras com um potencial de produção e comercialização ainda pouco explorado mas cujos frutos têm vindo a despertar um interesse crescente em alguns mercados. Por outro lado, são ambas espécies lenhosas, relativamente às quais o processo de embriogénese somática ainda apresenta algumas limitações. Deste modo, podem funcionar como um excelente modelo de estudo para espécies lenhosas, nas quais se inserem uma vasta quantidade de espécies com um elevado valor económico.

A embriogénese somática tem-se revelado como um método de micropropagação altamente eficaz no sentido de permitir a produção de um grande número de plantas num curto espaço de tempo. Contudo, este processo ainda demonstra ter algumas limitações.

O presente trabalho tem como principal objectivo aumentar o nível de conhecimento visando a optimização da embriogénese somática.

Deste modo, procedeu-se à realização de vários ensaios com o objectivo de otimizar as condições de regeneração de plantas por embriogénese somática nas duas espécies, através de modificações nos meios de cultura (hormonas vegetais e sacarose), condições de cultura (luz vs escuro), bem como o estado do material inoculado. Para além disso, realizaram-se análises bioquímicas e histoquímicas para caracterizar as substâncias de reserva (amido, lípidos e proteínas) de embriões zigóticos e somáticos na fase cotiledonar em *Feijoa sellowiana* Berg. e em *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.

Os resultados bioquímicos e histoquímicos demonstraram haver uma diferença acentuada do conteúdo lipídico entre embriões zigóticos - 48,5% e 46,6% - e embriões somáticos - 2,9% e 2,3%, de feijoa e tamarilho, respectivamente. O mesmo foi observado relativamente ao conteúdo proteico apesar de as diferenças não serem tão acentuadas. Os embriões zigóticos possuem 4,6% e 2,9% e os embriões somáticos 1,7% e 2,4%, de feijoa e tamarilho, respectivamente. Quanto aos resultados de cultura de tecidos é possível inferir que relativamente ao estado do material inoculado quer a inoculação de embriões zigóticos como a inoculação de sementes cortadas ao nível do tegumento, obtiveram a mesma taxa de sucesso de indução de embriogénese somática, em feijoa. A indução de embriogénese somática em feijoa é condicionada pela presença de luz. Também nesta espécie, a

dessecação por si só é um estímulo indutor de embriogénese somática a partir de embriões zigóticos.

As diferenças encontradas na análise quantitativa das diferentes substâncias de reserva embrionárias poderão ser um ponto-chave para a compreensão das limitações actualmente verificadas no processo de embriogénese somática. Serão necessários novos estudos para determinar a importância dos factores que influenciam essas substâncias de reserva no aumento da eficiência da embriogénese somática em termos biotecnológicos.

**Palavras-chave:** amido; espécies lenhosas; estudos histoquímicos, germinação; lípidos; maturação; proteínas.

---

---

**ABSTRACT**

---

---

Pineapple guava and tamarillo are fruit crops which the potential for fruit production and commercialization is still underexplored. However, interest for these crops has arisen in recent years in some markets. Both species are woody plants for which the somatic embryogenesis process still presents some limitations. Thus, they may serve as an excellent study model for woody species, amongst which there is a vast amount of species with high economic value.

Somatic embryogenesis has been shown to be a highly effective method of micropropagation as it enables the production of a large number of plants within a short period of time. However, this process still has some drawbacks impairing the success of plant regeneration.

This work's main objective was to increase the level of knowledge aimed at the optimization of somatic embryogenesis.

In order to achieve this, we proceeded to conduct various tests such as tissue culture, by varying the composition of the culture medium (plant hormones and sucrose) culture conditions (light *versus* dark), and the condition of the inoculated material, and biochemical and histochemical quantification of storage compounds (lipids, proteins and starch) of zygotic and somatic embryos at the cotyledonary stage in *Feijoa sellowiana* Berg. and *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.

The biochemical and histochemical results showed a marked difference between the lipid content of zygotic embryos - 48.5% and 46.6% - and somatic embryos - 2.9% and 2.3% - of pineapple guava and tamarillo, respectively. The same was observed for the protein content although the differences were not such pronounced: zygotic embryos possess 4.6% and 2.9% and somatic embryos 1.7% and 2.4%, for pineapple guava and tamarillo, respectively. It was also concluded that, isolated zygotic embryos and cut seeds, displayed similar levels of somatic embryogenesis induction. The induction of somatic embryogenesis in pineapple guava is conditioned by the presence of light. Also in this species, desiccation alone is a stimulus inducing somatic embryogenesis from zygotic embryos.

The differences found in the quantitative analysis of the different embryonic reserve substances may be a key point to understand the limitations currently found in the process

of somatic embryogenesis. Further studies are needed to determine the importance of the factors influencing these reserve substances in increasing the efficiency of somatic embryogenesis.

**Keywords:** germination; histochemical analysis; lipids; maturation; proteins; starch; woody species.

---



---

**ÍNDICE**


---



---

	Página
Agradecimentos	i
Abreviaturas	iii
Resumo	iv
Abstract	vi
Índice	viii
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1.Embriogénese zigótica</b>	<b>2</b>
<b>1.2.Embriogénese não zigótica</b>	<b>5</b>
<b>1.3.Embriogénese somática</b>	<b>6</b>
1.3.1.Tipos de embriogénese somática	7
1.3.2.Origem dos embriões somáticos	8
1.3.3.Da indução à conversão de embriões somáticos – regeneração de plantas	8
1.3.3.1.Indução	8
1.3.3.2.Desenvolvimento e maturação	10
1.3.3.3.Germinação de embriões somáticos e conversão em plântulas	11
1.3.4.Potencialidades e limitações da embriogénese somática	12
<b>1.4.Embriogénese zigótica versus embriogénese somática</b>	<b>13</b>
<b>1.5.Embriogénese somática em Mirtáceas</b>	<b>13</b>
1.5.1.Feijoa sellowiana Berg. – Feijoa	14
1.5.1.1.Caracterização e distribuição da espécie	14
1.5.1.2.Interesse da espécie	16
1.5.1.3.Multiplicação vegetativa convencional versus in vitro de feijoa	16
<b>1.6.Embriogénese somática em Solenáceas</b>	<b>17</b>
1.6.1Chyphomandra betaceae (Cav.) Sendt. - Tamarilho	18
1.6.1.1.Caracterização e distribuição da espécie	18
1.6.1.2.Interesse da espécie	19
1.6.1.3.Multiplicação vegetativa convencional versus in vitro de tamarilho	19
<b>1.7.Objectivos</b>	<b>20</b>

---

<b>2.MATERIAIS e MÉTODOS</b>	22
<b>2.1.Material vegetal</b>	22
2.1.1.Recolha e preservação de embriões zigóticos de feijoa e de tamarilho	23
<b>2.2.Indução de embriogénese somática em feijoa e em tamarilho</b>	24
2.2.1.Preparação dos meios de cultura	24
2.2.1.1.Feijoa	24
2.2.1.2.Tamarilho	24
2.2.2.Recolha e esterilização de sementes de feijoa e tamarilho	25
2.2.3.Extracção e inoculação em meio de indução de embriões zigóticos em feijoa e de calo embriogénico em tamarilho	26
2.2.3.1.Feijoa	26
2.2.3.2.Tamarilho	26
2.2.4.Condições de cultura de feijoa e de tamarilho	26
<b>2.3.Quantificação e análise histoquímica de substâncias de reserva em embriões zigóticos e somáticos de feijoa e de tamarilho</b>	27
2.3.1.Quantificação de substâncias de reserva	27
2.3.1.1.Preparação dos embriões zigóticos e somáticos	27
2.3.1.2.Quantificação de lípidos totais	27
2.3.1.2.1.Extracção de lípidos totais	28
2.3.1.2.2.Quantificação de lípidos totais – análise espectrofotométrica	29
2.3.1.3.Quantificação de proteínas totais	30
2.3.1.3.1.Extracção de proteínas totais	30
2.3.1.3.2.Quantificação de proteínas totais – análise espectrofotométrica	31
2.3.1.4.Quantificação de amido total	31
2.3.1.4.1.Extracção de amido total	32
2.3.1.4.2.Quantificação de amido total – análise espectrofotométrica	33
2.3.2.Análise histoquímica de substâncias de reserva	33
2.3.2.1.Preparação dos embriões zigóticos e somáticos	33
2.3.2.2.Fixação, pós-fixação e desidratação	33
2.3.2.3.Impregnação e realização de cortes semi-finos	34
2.3.2.4.Colorações	34
2.3.2.4.1.Coloração de lípidos – Negro de Sudão B	34

---

2.3.2.4.2. Coloração de proteínas – Azul de mercúrio de bromofenol	34
2.3.2.4.3. Coloração de amido – ácido periódico/reagente de Schiff (PAS)	35
2.3.2.5. Análise de substâncias de reserva ao microscópio óptico composto	35
<b>2.4. Efeito do estado do material inoculado na indução de embriogênese somática, em feijoa</b>	<b>36</b>
<b>2.5. Efeito de condições de cultura e de meios de cultura da indução à conversão de embriões somáticos, em feijoa</b>	<b>37</b>
2.5.1. Indução de embriões somáticos	37
2.5.2. Germinação de embriões somáticos e conversão em plântulas	38
2.5.2.1. Parâmetros e métodos de contagem	39
2.5.2.2. Conversão de ES cotiledonares e ES normais germinados no ápice em plântulas	39
<b>2.6. Efeito da dessecação na indução de embriogênese somática, em feijoa e tamarilho</b>	<b>41</b>
2.6.1. Feijoa	41
2.6.2. Tamarilho	42
<b>2.7. Efeito da concentração da auxina 2,4-D no meio de cultura na indução de embriogênese somática em feijoa</b>	<b>44</b>
<b>2.8. Análise estatística</b>	<b>44</b>
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>45</b>
<b>3.1. Estudos quantitativos e histoquímicos de substâncias de reserva em embriões zigóticos e somáticos de feijoa e de tamarilho</b>	<b>45</b>
3.1.1. Lípidos totais	46
3.1.1.1. Análise quantitativa	46
3.1.1.2. Análise histoquímica	47
3.1.2. Proteínas totais	47
3.1.2.1. Análise quantitativa	47
3.1.2.2. Análise histoquímica	48
3.1.3. Amido total	48
3.1.3.1. Análise quantitativa	48
3.1.3.2. Análise histoquímica	49

---

<b>3.2. Estudo do efeito do estado do material inoculado na indução de embriogênese somática em feijoa</b>	53
<b>3.3. Estudo do efeito de condições e de meios de cultura na indução e conversão de embriões somáticos de feijoa</b>	56
3.3.1. Indução de embriões somáticos	56
3.3.2. Germinação de embriões somáticos e conversão em plântulas	60
3.3.3. Conversão de embriões somáticos cotiledonares e embriões somáticos normais germinados no ápice em plântulas	64
<b>3.4. Estudo do efeito da dessecação na indução de embriogênese somática em feijoa e tamarilho</b>	68
3.4.1. Feijoa	68
3.4.2. Tamarilho	71
<b>3.5. Estudo do efeito da concentração de auxina 2,4-D no meio de cultura, na indução de embriogênese somática em feijoa</b>	74
<b>4. DISCUSSÃO e CONCLUSÕES</b>	77
<b>5. BIBLIOGRAFIA</b>	84

## 1. INTRODUÇÃO

As plantas desempenham um papel fundamental e vital grande parte dos ecossistemas. O modo fisiológico como se auto-sustentam (seres autotróficos), nomeadamente através do processo fotossintético, contribui de forma fundamental para o funcionamento de uma grande parte dos ecossistemas e, em última análise para a manutenção da vida tal como a conhecemos. Como exemplo mais básico e de conhecimento geral da sua extrema importância temos a fixação de dióxido de carbono atmosférico e libertação de oxigénio, elemento imprescindível à vida. No entanto, apesar do conhecimento geral parece que, ainda hoje, este fundamento é extremamente relativizado em prol de benefícios económicos e de outros factores de discussão irrelevante neste trabalho.

Apesar do acima referido, é evidente a dependência e o valor que a humanidade atribui às plantas, dado que estas fazem parte do seu dia-a-dia no que concerne à função básica da alimentação. A evolução da humanidade é relatada sempre associada ao potencial do solo em produzir alimento, desde as populações nómadas até às actuais. Desde sempre, as plantas ou parte delas também foram utilizadas para a produção de utensílios. Actualmente as plantas, são fonte de uma imensa quantidade de produtos de

interesse como, a madeira, a borracha, os óleos vegetais e os compostos atractivos para a indústria farmacêutica. A noção da importância das plantas associada crescimento exponencial da população humana e consequente necessidade de a servi, desencadeou uma tendência global para as domesticar, melhorar e preservar.

Tendo em conta, desde cedo, estas e outras perspectivas as plantas são alvo de interesse e de estudo pela comunidade científica. Ao longo de décadas até aos dias de hoje, desde as características macro às microscópicas, o investimento no conhecimento destes organismos é elevado e de certo modo tem contribuído, não só para salientar a sua importância no ecossistema global, mas para melhorar sustentavelmente a qualidade de vida da espécie humana.

### **1.1. Embriogénese zigótica**

Ao presenciarmos a germinação de uma nova planta a partir de uma semente é imprescindível ter em consideração que se trata de uma visão minimalista. Na realidade a germinação é fruto de um conjunto de acontecimentos complexos que ocorrem no embrião contido na semente.

O órgão reprodutor feminino das angiospérmicas, designado por gineceu, é constituído por estigma, estilete e ovário. É no ovário, no interior do óvulo, que os processos de macrosporogénese e macrogametogénese ocorrem conduzindo à formação do saco embrionário. Neste, após a sua diferenciação, além de outras células, estão contidos o gameta feminino – oosfera – e a célula central. O órgão reprodutor masculino, androceu, é genericamente composto por filete e antera. É na antera, constituída por sacos polínicos que ocorre a formação de microgametófitos - grãos de pólen – e é nestes que ocorre a microgametogénese com a formação dos gametas masculinos - células espermáticas.

O zigoto resulta da fusão da oosfera com uma célula espermática dando-se assim a fecundação. Nas angiospérmicas, ocorre um processo designado por dupla fecundação, isto é, para além da formação do zigoto, um outro gameta masculino funde-se com a célula central, formando uma célula triplóide. O desenvolvimento do zigoto origina o embrião e o desenvolvimento da célula triplóide origina o endosperma (Park & Harada, 2008).

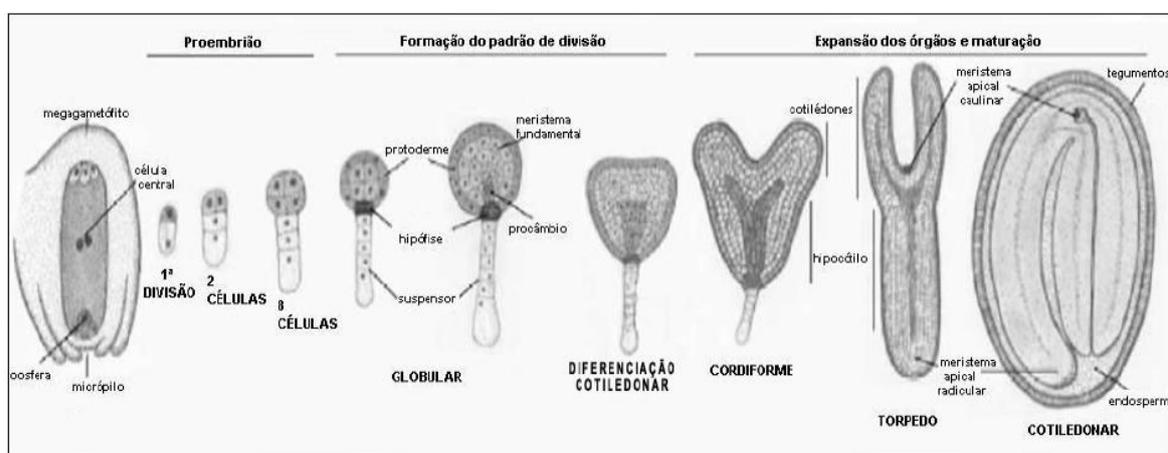
Após a fecundação, o ovário desenvolve-se num fruto e o óvulo numa semente. A semente é composta, de um modo geral, pela testa, formada a partir de um ou ambos os tegumentos do óvulo, pelo endosperma e pelo embrião (Bewley & Black, 1994).

O endosperma desempenha um papel fundamental durante as primeiras fases do desenvolvimento embrionário. É constituído na sua maioria por substâncias de reserva que auxiliam o desenvolvimento do embrião. Todavia, a presença ou ausência do endosperma na semente madura, leva a catalogar as sementes como endospérmicas ou não-endospérmicas, respectivamente. Como é obvio, o facto da semente ser ou não endospérmica, não implica necessariamente a inexistência do endosperma nas fases precoces de desenvolvimento. Quando a semente é não-endospérmica, é no embrião que ocorre a acumulação de substâncias de reserva, principalmente ao nível cotiledonar mas também nas células de outros órgãos embrionários (Raghavan, 2006).

As substâncias de reserva acumuladas nos tecidos celulares variam qualitativa e quantitativamente de espécie para espécie. Poder-se-ão dividir em três tipos: hidratos de carbono, lípidos e proteínas. O principal hidrato de carbono é o amido, que fica armazenado sob a forma granulosa em amiloplastos. Os lípidos e as proteínas encontram-se armazenados, respectivamente, em corpos lipídicos e proteicos. É ainda possível encontrar compostos alcalóides, fenólicos e fitina (Raghavan, 2006)

Durante o desenvolvimento embrionário as alterações morfológicas são inequivocamente acompanhadas por alterações quantitativas e qualitativas das substâncias de reserva, como consequência da intensa actividade metabólica. Desde a primeira divisão celular até à maturação os embriões das dicotiledóneas passam por cinco fases bem definidas e descritas. A primeira fase compreende as alterações morfológicas desde a primeira divisão do zigoto até à diferenciação da protoderme (Capron *et al.*, 2009; Canhoto, 2010) e é designada por pró-embrião. Durante esta etapa é de salientar que em muitas plantas (incluindo *Arabidopsis*) a primeira divisão mitótica é assimétrica e origina uma célula apical, que posteriormente dará origem ao embrião, e uma célula basal cuja sua diferenciação potencia a formação do suspensor, estrutura que assegura a ligação do embrião ao tecido materno (Fig.1). Segue-se a fase globular que, tal como o nome indica, é um conjunto de células com forma esférica e simetria radial, caracterizada pela intensa actividade mitótica. Nesta fase, já é perceptível a presença da protoderme, bem como diferenciação dos tecidos vasculares. O suspensor (Fig.1) já está completo e ao longo dos estádios seguintes irá passar por um processo de morte celular programada, tornando-se gradualmente menos visível (Mordhorst *et al.*, 1997). A terceira fase designa-se por cordiforme. Este estágio de desenvolvimento é caracterizado por haver a passagem de simetria radial para simetria bilateral – diferenciação apical-basal – com o início da diferenciação cotiledonar associada ao transporte polar de auxina. Assim, nesta fase

morfológica já é possível diferenciar o embrião em zonas distintas (Fig.1) tais como, cotilédones, meristema apical do caule (SAM), eixo hipocótilo-raiz e meristema apical da raiz (RAM). Acentuando-se a diferenciação dos cotilédones e o alongamento do embrião é possível considerar que o embrião se encontra na fase de torpedo (Fig.1). É também, nesta fase, que o embrião começa a acumular as substâncias de reserva, inicialmente contidas no endosperma, bem como se verifica a degeneração total do suspensor. Por último, a fase cotiledonar na qual os cotilédones se encontram bem diferenciados, com a presença de eixo raiz-hipocótilo, meristemas apicais (radicular e caulinar), tecidos vasculares bem nítidos (Taiz & Zeiger, 2006) e todas as células do embrião repletas de substâncias de reserva (Fig.1).



**Figura 1** – Esquema representativo do desenvolvimento embrionário em *Arabidopsis thaliana* (adaptado de Arnold *et al.*, 2002)

Concluídas as fases acima descritas, o embrião completa o processo morfogénico, e ocorre uma grande perda de água, ou seja, dessecação. Num elevado número de espécies e condições ambientais o embrião entra numa fase de dormência esperando estrategicamente que as condições sejam as mais adequadas para germinar, como resultado da actividade dos meristemas apicais do caule e câmbios.

Como nota final é importante referir que este é o padrão de desenvolvimento observado em *Arabidopsis* e em *Capsella bursa-pastoris*, duas crucíferas usadas como espécies modelo no estudo da embriogénese zigótica. No entanto, muitas excepções existem a este padrão de desenvolvimento, não apenas nas monocotiledóneas e gimnospérmicas, onde o desenvolvimento embrionário é morfológicamente muito diferente do que se verifica nas dicotiledóneas, mas também entre diferentes grupos de dicotiledóneas (Raghavan, 2006; Canhoto, 2010).

## 1.2. Embriogénese não zigótica

Segundo Mordhorst *et al.* (1997), nas plantas, a formação de embriões não é um fenómeno exclusivo do zigoto, apesar da embriogénese estar normalmente associada à reprodução sexuada e à divisão e diferenciação do zigoto para originar o embrião (Correia, 2007). Nas plantas têm sido descritos casos em que outras células têm capacidade de gerar estruturas análogas a embriões zigóticos. A embriogénese nas plantas não está dependente da fecundação (Garcês, 2006), ou seja, muitas espécies desenvolveram estratégias de reprodução assexuada de modo a ultrapassar factores genéticos e ambientais que impedem a fertilização (Arnold *et al.*, 2002).

Os casos de embriogénese não zigótica, isto é, a formação de embriões a partir de outras células que não o zigoto poder-se-ão dividir em três situações particulares: embriões com origem no sistema reprodutor feminino (intraovulares); embriões com origem no sistema reprodutor masculino e embriões capazes de serem gerados através de qualquer parte do corpo da planta. Esta última divisão engloba as duas iniciais. Contudo, é mais fácil para a sua explicitação uma vez que a maioria dos acontecimentos descritos na literatura se relacionam com os órgãos envolvidos na reprodução.

É frequente em algumas famílias de angiospérmicas como as Rutaceae e as Myrtaceae (Canhoto, 1994) o aparecimento de mais do que um embrião por semente, fenómeno ao qual se atribui o nome de poliembrionia. No entanto, outra das situações mais relatadas de embriogénese não zigótica denomina-se apomixia. Este acontecimento traduz-se na produção de embriões apomíticos a partir de células gaméticas não fertilizadas ou de células somáticas (Koltunow & Grossniklows, 2003).

A apomixia é classificada de acordo com o tipo de tecido que originou o embrião. A apomixia adventícia ocorre quando os embriões surgem a partir de células do nucelo, dos tegumentos do óvulo (Ozias-Akins, 2006), da proliferação do suspensor ou do tegumento da semente (Raghavan, 1986). Outros tipos são a apomixia diplospórica e apospórica, das quais resultam embriões derivados directamente de células de sacos embrionários formados a partir de macrosporos não reduzidos, sem que ocorra fecundação (Canhoto, 1994; Mordhorst *et al.*, 1997; Ozias-Akins, 2006). Tal como os embriões zigóticos, os embriões formados de acordo com o descrito estão protegidos pela semente e a sua dispersão ocorre naturalmente.

Quanto aos embriões com origem no sistema reprodutor masculino podem surgir embriões a partir de microsporos ou grãos de pólen imaturos, através do processo de

embriogéneses polínica ou androgéneses (Canhoto, 2010). A estes embriões poder-se-á atribuir a designação de polínicos ou androgénicos. Este processo ocorre maioritariamente por indução *in vitro*, tendo em vista as potencialidades na produção de haplóides e haplóides-duplos importantes no melhoramento vegetal.

As células do corpo (soma) da planta podem formar embriões espontaneamente (Mordhorst *et al.*, 1997). São células somáticas e, por isso, os embriões que delas advêm designam-se por embriões somáticos os quais, por sua vez, são geneticamente idênticos à planta-mãe.

Esta característica única e exclusiva do reino das plantas, suscitou na comunidade científica uma enorme curiosidade tendo por consequência surgido a necessidade de aumentar o número de ensaios para perceber os mecanismos envolvidos neste processo, bem como para posteriormente tirar proveito das suas potencialidades.

### **1.3. Embriogéneses somáticas**

Por definição a embriogéneses somática é um processo em que as células somáticas, sob condições indutoras, formam células embriogénicas que, ulteriormente sofrem uma série de mudanças morfológicas e bioquímicas resultando na formação de embriões designados por somáticos (Zimmerman, 1993; Schmidt *et al.*, 1997; Komamine *et al.*, 2005; Rose *et al.*, 2010). Esta propriedade assenta no princípio celular da totipotência, isto é, na capacidade de regenerar totalmente um novo organismo a partir de uma célula que não o zigoto (Raghvan, 1986; Figueroa *et al.*, 2006). É de salientar que nem mesmo células diferenciadas das plantas estão irreversivelmente direccionadas para um determinado padrão de desenvolvimento (Chawla, 2009).

Uma vez que através do processo de embriogéneses somática é possível obter embriões e posteriormente plantas geneticamente iguais à planta que lhes deu origem, ou seja, clones, este método funciona como uma excelente ferramenta de micropropagação e melhoramento vegetal. Este processo pode ser aproveitado como modelo de estudo de eventos morfológicos, fisiológicos, moleculares e bioquímicos. Tendo em conta que a biotecnologia vegetal, segundo Pais (2003), tem como objectivo a utilização de plantas, suas partes ou células para produzir ou melhorar moléculas ou plantas, tendo em vista um objectivo específico e uma finalidade sócio-económica, este processo tem um grande potencial para aplicações biotecnológicas, nomeadamente na produção de sementes artificiais, micropropagação, plantas transgénicas entre outras (Figueroa *et al.*, 2006).

Como foi referido anteriormente, a embriogénese somática constitui um excelente modelo de estudo, tendo começado desde cedo, a tentativa de analisar todos os mecanismos envolvidos nesse processo. As primeiras descobertas datam de 1947 e são atribuídas a Levine que descreveu a obtenção de plântulas de cenoura (*Daucus carota*) a partir de tecidos expostos a baixos níveis de ácido  $\alpha$ -naftalenoacético, através de um processo cuja descrição é semelhante ao de embriogénese somática (Merkle *et al.*, 1995). No decorrer dos anos as teorias formuladas são inúmeras, todavia a percepção total deste mecanismo está longe de ser atingida.

### **1.3.1. Tipos de embriogénese somática**

Podem considerar-se dois tipos de embriogénese somática: embriogénese directa, quando os embriões obtidos se formam directamente a partir do explante utilizado; embriogénese indirecta, quando a partir do explante inicial se forma um calo onde apenas algumas células são induzidas embriogenicamente (Sharp *et al.*, 1980). Segundo a sua teoria Sharp *et al.* (1980), consideram a existência de dois tipos de células, associadas aos dois tipos de embriogénese somática descritos. As células embriogenicamente pré-determinadas (CEPD) que, para a formação de um embrião somático através do explante onde se encontram, necessitam apenas de um estímulo que desencadeie a divisão celular. Neste caso as CEPD necessitam apenas de condições de cultura apropriadas para exprimirem a sua totipotência. Por outro lado, as células embriogénicas determinadas por indução (CEDI), que necessitam de sofrer vários ciclos mitóticos, na presença de uma auxina, durante a indução embriogénica, ou seja, as células resultantes das divisões celulares manifestam-se sobre a forma de calo (passo intermédio entre o explante e a formação de embriões somáticos). No entanto, se esse calo contém CEPD é necessário apenas um estímulo para que haja a formação de embriões somáticos (Figuroa *et al.*, 2006).

Segundo Yeung (1995) na embriogénese directa, as células respondem ao estímulo, tornando-se determinadas num curto período de tempo, sem que haja previamente proliferação celular. Ao invés, na embriogénese indirecta, é necessário um período mais longo para adquirir o estado embriogénico, o qual é precedido pela proliferação celular. Contudo, é relevante salientar que existem casos em que os embriões somáticos formados não conseguem atingir as fases mais avançadas de desenvolvimento, voltando a proliferar e a originar novos embriões (ex: loureiro). A este processo atribui-se o nome de

embriogénese repetitiva, secundária ou cíclica que, segundo Canhoto (2010), torna este método extremamente eficaz na produção de uma grande quantidade de embriões.

O motivo, ou motivos, que levam a este comportamento celular em cultura não são conhecidos, embora possam estar relacionados com o sistema endógeno hormonal e/ou mecanismos de inactivação ou degradação das auxinas nos diferentes tecidos (Canhoto, 2010).

### **1.3.2. Origem dos embriões somáticos**

De acordo com os estudos efectuados em diferentes espécies é possível afirmar que os embriões somáticos podem ter origem unicelular ou pluricelular e ainda os dois tipos de origem na mesma espécie, como no caso da feijoa (Canhoto & Cruz, 1996).

Os embriões somáticos com origem unicelular são formados por uma célula por norma contida na camada de células epidérmicas ou subepidérmicas do explante induzido. Os embriões somáticos com origem pluricelular advêm de um agregado de células do tipo meristemático (Canhoto & Cruz, 1994; Canhoto *et al.*, 1996).

### **1.3.3. Da indução à conversão de embriões somáticos – regeneração de plantas**

#### **1.3.3.1. Indução**

Como noutras técnicas de micropropagação, são vários os factores que condicionam e afectam a indução de embriogénese somática: o meio de cultura; o tipo de explante; o genótipo da planta dadora e as condições de cultura são parâmetros a ter em consideração (Thorpe & Stasolla, 2001).

A composição do meio de cultura em que se vai induzir a embriogénese somática, poderá ser considerado dos factores mais importantes. A composição varia de espécie para espécie e, mesmo dentro de uma espécie, de acordo com o explante (parte da planta) em que a indução irá ser feita. São vários os elementos constituintes do meio que se podem fazer variar quer qualitativa quer quantitativamente. A composição hormonal e os hidratos de carbono são dos parâmetros mais relevantes.

Embora seja possível, em algumas espécies, induzir embriogénese sem hormona (Thorpe & Stasolla, 2001), por norma a indução de embriões somáticos requer a presença de um estímulo quer seja uma condição de stress ou a presença de hormonas vegetais,

nomeadamente auxinas (Yang & Zhang, 2010). A auxina mais utilizada é 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), mas outras como NAA (ácido  $\alpha$ -naftaleno acético), IBA (ácido indol-3-butírico), IAA (ácido-3-indolacético) ou picloram também podem ser aplicadas (Canhoto, 2010). Na maioria dos casos, o desenvolvimento dos embriões apenas ocorre se ao período de indução por auxina se seguir a transferência destas estruturas para meios sem auxina ou níveis reduzidos da mesma hormona (Cruz *et al.*, 1990; Rose *et al.*, 2010; Yang & Zhang, 2010).

Os hidratos de carbono principalmente a sacarose, tem-se revelado, em algumas espécies, como potenciadora da resposta embriogénica. Estes elementos metabolizáveis, funcionam como fonte de carbono mas também desempenham um papel osmótico, interferindo possivelmente com as vias metabólicas associadas à produção de hormonas vegetais (Canhoto, 2010)

Os compostos azotados, estão presentes no meio de cultura muitas vezes sobre a forma de suplementos de aminoácidos, podendo afectar a resposta embriogénica através da variação do pH extracelular (Dal Vesco & Guerra, 2001). Metais pesados e pH podem também funcionar como agentes indutores (Yeung, 1995; Alvelos, 2002).

Mais recentemente tem sido dado algum destaque a os níveis de cálcio que, por ser um importante mensageiro secundário na cascata de sinalização, pode também condicionar a indução de embriogénese somática (Rose *et al.*, 2010; Yang & Zhang, 2010).

São vários os tipos de explantes que podem ser utilizados para a indução de embriogénese somática tais como, folhas, caules, cotilédones, hipocótilos, pétalas, sépalas, raízes, anteras ou embriões zigóticos maduros ou imaturos) (Canhoto, 2010). É de salientar que estruturas jovens respondem melhor do que tecidos adultos ou mais diferenciados (Gaj, 2004). O estado fisiológico da planta dadora de explantes deve também ser tido em consideração.

O genótipo da planta dadora parece, em alguns casos, um factor determinante. Verifica-se que a resposta embriogénica ao estímulo é mais facilmente obtido em determinados cultivares do que noutros (Canhoto *et al.*, 2006; Krikorian, 2000). Esta ideia evoca o facto de genótipos individuais dentro de uma dada espécie variarem significativamente na capacidade embriogénica. Segundo Merkle *et al.* (1995), tais diferenças genotípicas podem reflectir diferença na capacidade de activar elementos-chave na via embriogénica.

Por último, as condições de cultura como, a temperatura e luminosidade são factores importantes. A luminosidade varia de espécie para espécie e de explante para

explante. Por exemplo, há situações de indução que são mais bem conseguidas no escuro e outras exigem luz continuamente e ainda outras em que a alternância entre luz e escuro é imprescindível (Canhoto, 2010). Quanto à temperatura não existem muitos dados e na maioria dos casos é utilizada uma temperatura entre 24°C e 27°C (Canhoto, 2010).

### 1.3.3.2. Desenvolvimento e maturação

As fases iniciais do desenvolvimento embrionário zigótico estão altamente padronizadas e definidas, mas o mesmo não acontece ao iniciar-se a embriogênese somática. No entanto, a partir da fase globular ambos os desenvolvimentos embrionários apresentam estádios morfológico muito semelhantes, ou seja, à fase globular seguem-se a cordiforme, torpedo e cotiledonar (Fig.2).



**Figura 2** – Fases de desenvolvimento embrionário somático em *Feijoa sellowiana*  
(Canhoto, 1994)

As condições de cultura que potenciam o desenvolvimento somático são, por norma, diferentes das que se aplicam na indução, principalmente em termos da constituição do meio de cultura. De acordo com referido anteriormente (Cruz *et al.*, 1990), na maioria dos casos o desenvolvimento dos embriões apenas ocorre se ao período de indução por auxina se seguir a transferência destas estruturas para meios sem auxina ou níveis reduzidos da mesma hormona. Nos embriões zigóticos as auxinas desempenham um papel fundamental na mudança da simetria radial (fase globular) para a bilateral (fase cordiforme). Nos embriões somáticos parece que a presença e papel das auxinas é também relevante. Segundo experiências com inibidores de transporte polar de auxinas (TIBA - ácido 2,3,5-triidobenzóico), estes têm efeito negativo em termos do número de embriões que passam à fase embrionária seguinte e potencia o aumento de anomalias. Estes dados

sugerem que os mecanismos de controlo da transição de simetria são os mesmos em embriões zigóticos e somáticos (Canhoto, 2010).

Contudo, existem fenómenos morfológicos e químicos durante o desenvolvimento importantes de referenciar: o aparecimento de uma estrutura muito semelhante ao suspensor nos embriões somáticos; a estrita associação de embriões somáticos a células ricas em compostos fenólicos; a oscilação de substâncias de reserva. Todos estes factores se encontram de algum modo relacionados.

Durante o desenvolvimento de embriões zigóticos o suspensor está presente estabelecendo o contacto entre o embrião e o tecido materno (Raghavan, 2006). No desenvolvimento de embriões somáticos, em angiospérmicas, esta estrutura nem sempre está presente. A justificação para tal acontecimento poderá estar no facto de grande parte dos nutrientes se encontrarem no meio de cultura (Correia & Canhoto, 2010)

A associação de embriões somáticos a células repletas de compostos fenólicos, também suscita interesse no sentido em que estas se localizam entre o embrião e o tecido da planta-mãe, formando uma delimitação entre ambos e, conseqüente separação. Contudo, o modo como os compostos fenólicos interferem com a embriogénese não está estabelecido. Durante o desenvolvimento sabe-se que a oxidação destes compostos nos tecidos em meio de cultura tem um efeito negativo (Reis *et al.*, 2008).

Na última fase de desenvolvimento embrionário (zigótico e somático) há a acumulação de substâncias de reserva nas células embrionárias. No entanto, os embriões zigóticos têm capacidade de perda de água e de entrar num período de dormência. O mesmo não ocorre nos embriões somáticos em que a maturação é sempre o passo seguinte - embriogénese contínua – uma vez que, a perda de água é impossível por se encontrarem em meio de cultura (Rose *et al.*, 2010).

Nos embriões somáticos a maturação é feita mais eficazmente com a adição de ácido abscísico (ABA) ao meio e/ou agentes osmóticos como o manitol e o sorbitol. Estes compostos interferem positivamente na acumulação de substâncias de reserva e nos embriões que têm tendência para germinar precocemente (Canhoto *et al.*, 2009).

### **1.3.3.3. Germinação de embriões somáticos e conversão em plântulas**

Por definição, a germinação inicia-se com a absorção de água pela semente e termina com o alongamento do eixo embrionário, tudo o resto são eventos pós-germinativos (Bewley & Black, 1994; Canhoto, 2010).

Mais uma vez é atribuída importância à constituição do meio de cultura. Nos embriões somáticos a germinação é conseguida após a transferência do explante para um meio sem hormona e/ou com baixo teor de açúcares. A adição de suplementos como GA<sub>3</sub> (ácido giberélico) e citocininas, muitas vezes também é imprescindível. Na germinação e conversão também as condições de cultura são relevantes.

A germinação de embriões somáticos tem sido dificultada pelo aparecimento de um elevado número de embriões anómalos e embriões precocemente germinados. A variação somaclonal é muito frequente.

#### **1.3.4. Potencialidades e limitações da embriogênese somática**

A embriogênese somática constitui uma excelente ferramenta para estudos de mecanismos associados à expressão de totipotência celular em plantas. É considerada, por muitos autores, um sistema modelo para estudos moleculares, citológicos, fisiológicos e dos padrões relativos à embriogênese em plantas (Fehér *et al.*, 2003; Figueroa *et al.*, 2006).

Na biotecnologia vegetal, a embriogênese somática, é considerada um sistema de propagação em grande escala de plantas (Figueroa *et al.*, 2006), bem como um sistema importante em programas de melhoramento genético (Stassolla & Yeung, 2003). Segundo Canhoto (2010), dos métodos usados na propagação clonal, a embriogênese somática é potencialmente o mais importante, uma vez que, é capaz de originar um grande número de plantas num curto período de tempo e, ao contrário de outras metodologias de micropropagação, não é necessário proceder ao enraizamento o que encurta também o período de regeneração.

Todavia, este processo apresenta limitações no que respeita a alguns processos biológicos que não conseguem ser estudados, como sejam, o momento da fecundação, a diferenciação do endosperma, a interacção endosperma-embrião, principalmente na absorção de substâncias de reserva, o processo de dessecação e a entrada em dormência por parte do embrião (Figueroa *et al.*, 2006).

Em termos biotecnológicos e de cultura *in vitro* a embriogênese somática apresenta algumas limitações. É o caso da germinação precoce, o elevado número de embriões somáticos anómalos (Liu, 2004), a falta de sincronização das fases durante o desenvolvimento dos embriões, a ocorrência de variação somaclonal e as baixas taxas de conversão.

#### **1.4. Embriogénese zigótica versus embriogénese somática**

Apesar dos embriões zigóticos e somáticos passarem pelas mesmas fases morfológicas no decorrer do desenvolvimento embrionário e terem a potencialidade de originar uma nova planta, as condições onde estes processos decorrem estão longe de ser idênticas, nomeadamente no que diz respeito ao ambiente físico e fisiológico. Em seguida serão descritas as principais diferenças entre embriões zigóticos e somáticos.

- 1) Os embriões zigóticos têm origem unicelular (zigoto). Os embriões somáticos têm uma origem unicelular ou pluricelular.
- 2) Os embriões zigóticos são formados no interior do saco embrionário, estando constantemente protegidos no interior da semente, pelo endosperma (durante as fases iniciais de desenvolvimento). Ao contrário os embriões somáticos são formados sobre o meio de cultura sem qualquer tipo de tecido de protecção e de nutrição.
- 3) O padrão das primeiras divisões celulares na embriogénese zigótica é extremamente bem definido ao invés do que ocorre durante as primeiras etapas da embriogénese somática.

Tendo em conta estas características é possível dizer que as diferenças primordiais entre embriões zigóticos e somáticos residem na sua origem e local de formação o que, obviamente, poderá condicionar as primeiras fases de desenvolvimento.

Os aspectos demonstrados não são os únicos, mas sim os mais relevantes e que estão, possivelmente, na base de todas as diferenças que poderão ocorrer posteriormente e que ao longo da dissertação têm vindo a ser explicitadas.

#### **1.5. Embriogénese somática em mirtáceas**

A família Myrtaceae é constituída por 130 géneros que envolvem cerca de 3000 espécies (Canhoto *et al.*, 1999).

São plantas de hábito arbustivo ou arbóreo, cuja distribuição incide principalmente nos trópicos e nos subtropicais. Além da importância económica de muitas espécies como o

*Eucalyptus* spp., utilizado na produção de pasta de papel (Trindade, 1996), a família das mirtáceas engloba um elevado número de plantas frutíferas, como *Eugenia* spp., *Feijoa sellowiana*, *Myrciaria* spp. ou *Psidium* spp.

Apesar de o número de ensaios *in vitro* com espécies desta família ter vindo a aumentar nos últimos anos, à semelhança do que se verifica nas outras lenhosas, existem ainda algumas limitações quer em relação ao número de espécies estudadas quer no que diz respeito aos resultados obtidos (Canhoto *et al.*, 1999). Segundo Trindade (1996), continua a dar-se preferência aos métodos de propagação convencional como estratégia de clonagem. Porém, a dificuldade de aplicação e os baixos rendimentos destes métodos levam a considerar a aplicação de técnicas de cultura *in vitro* como alternativa útil para o estabelecimento de protocolos de multiplicação rápida e em grande escala e estudos de manipulação genética destas espécies (Canhoto *et al.*, 1999).

O género mais estudado tem sido o *Eucalyptus*, sendo o protocolo mais bem sucedido o de multiplicação de meristemas axilares. Contudo, outros ensaios também têm sido implementados mas com resultados menos conseguidos, nomeadamente de organogénese e de embriogénese somática (Canhoto, 1994).

Os ensaios de embriogénese somática referem-se a um grupo restrito de espécies como *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus dunnii*, *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus grandis*, *Eugenia jambos*, *Eugenia malaccensis*, *Feijoa sellowiana*, *Myrciaria cauliflora* e *Myrtus communis* (Trindade, 1996; Nugent *et al.*, 2001).

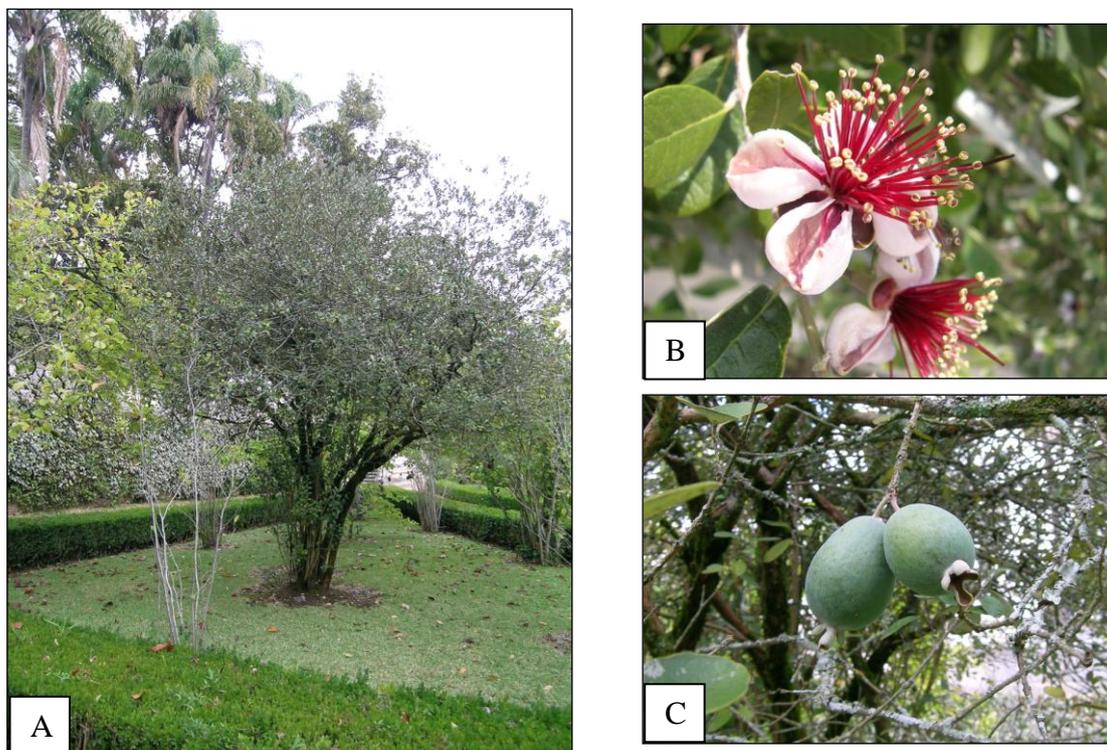
### **1.5.1. *Feijoa sellowiana* Berg. – Feijoa**

#### **1.5.1.1. Caracterização e distribuição da espécie**

*Feijoa sellowiana* Berg., ou *Acca sellowiana* de acordo com alguns autores, faz parte da família Myrtaceae. São vários os nomes comuns que se podem atribuir a esta planta. Os mais utilizados são feijoa e *pineapple guava*. O seu nome científico constitui uma homenagem ao autor F. Sellow que recolheu, em 1819, os primeiros espécimes classificados por Berger e ao director do Museu de História Natural de São Sebastião, no Brasil, J. Feijó (Canhoto, 1994).

É uma espécie originária da América do Sul (Argentina, Paraguai, sul do Brasil e Uruguai), tendo os primeiros espécimes chegado à Europa (Riviera Francesa) pelo naturalista E. André. Posteriormente, a planta foi propagada por toda a Europa chegando a

Portugal. Os dados temporais da sua introdução em Portugal são escassos, apenas se sabe que os espécimes mais antigos se encontram no Jardim Botânico de Lisboa e de Coimbra tendo sido possivelmente plantados no início do século XX. Actualmente a distribuição da feijoa é mundial, sendo na Nova Zelândia o país em que o cultivo atinge maior desenvolvimento e consequentemente maior taxa de exportação (Canhoto & Cruz, 1996).



**Figura 3** – Características morfológicas de *Feijoa sellowiana* (Jardim Botânico de Coimbra). A - Árvore de feijoa; B – Flores abertas; C – Frutos maduros.

Trata-se de uma pequena árvore ou arbusto perene (Fig. 3) com uma altura compreendida entre os 2-4m, podendo atingir excepcionalmente 7-8 m. Os ramos são cilíndricos, opostos, cinzento-avermalhados e glabros. As suas folhas são perenes, opostas, pecioladas, de forma oval ou elíptica, com 4-6cm de comprimento, verdes na página superior e verde-esbranquiçadas na página inferior, devido à presença de um indumento (Mattos, 1969).

Os botões florais surgem na axila das folhas durante o crescimento dos ramos e o período de floração (Fig. 3), em Portugal, ocorre entre Abril e meados de Junho (Canhoto, 1994). As flores são hermafroditas e apresentam-se isoladas ou em pares. Cada flor contém quatro sépalas verdes e quatro pétalas branco-avermelhadas, sendo o número de estames indefinido (varia entre 40 a 80) e apresentam coloração vermelha (Canhoto & Cruz, 1994).

Em Portugal, a frutificação (Fig. 3) ocorre desde o início de Outubro até finais de Novembro (Canhoto, 1994; Canhoto & Cruz, 1996). Os frutos são de cor verde, carnudos, oblongos ou ovóides, com 4-6 cm de comprimento. Quando maduros exalam uma fragrância agradável devido à produção de compostos voláteis. O número de sementes por fruto é variável, sendo estas branco-amareladas, pequenas com cerca de 2-3 mm (Canhoto, 1994).

#### **1.5.1.2. Interesse da espécie**

Os frutos de feijoa são desde há muito tempo apreciados pelos povos nativos das regiões de onde a espécie é originária. Possuem um sabor misto de ananás e goiaba, sendo extremamente ricos em vitamina C, hidratos de carbono, e minerais (potássio e iodo). Podem ser consumidos frescos ou utilizados na produção de geleias, sumos, licores, iogurtes entre outros produtos alimentares (Canhoto, 1994).

As folhas, nas regiões de onde a planta é originária, são ainda utilizadas na medicina popular na produção de chás contra a disenteria e cólera e os extractos de frutos parecem ter propriedades anti-microbianas. O sabor das pétalas parece ser adocicado podendo estas ser utilizadas em saladas (Canhoto & Cruz, 1996).

A planta é também utilizada como ornamental devido à sua beleza floral.

#### **1.5.1.3. Multiplicação vegetativa convencional versus *in vitro* de feijoa**

Através dos métodos convencionais de multiplicação vegetativa a feijoa pode ser multiplicada por sementes, por estacaria ou alporquia. Na multiplicação por sementes, se por um lado estas germinam rapidamente, por outro lado a sua viabilidade é perdida da mesma forma. Além destes factos, em cultivares com polinização cruzada, não há manutenção das características seleccionadas. Em comparação com a estacaria, a multiplicação por sementes é mais lenta por isso, a estacaria é um método de propagação mais utilizado. A alporquia também pode ser executada nesta espécie, uma vez que, durante o seu crescimento as plantas emitem ramos junto à base. As culturas de feijoa são extremamente sensíveis e alvo de parasitas tais como, larvas de coleópteros, nemátodes e alguns fungos como *Botrytis cinerea*, *Phytophthora* spp. e *Pythium* spp., por outro lado são altamente resistentes ao frio e geadas (Canhoto & Cruz 1996).

Durante muitos anos apenas havia registo de cultura de ápices de segmentos nodais e de organogénese a partir de calos com origem em folhas imaturas (Bhojwani *et al.*, 1987). Actualmente os estudos têm sido os mais diversos para conseguir regenerar plantas, por embriogénese somática (Canhoto *et al.*, 1994, 1995, 1996; Cangahuala-Inocente *et al.*, 2004), mas também através de organogénese, de segmentos nodais, de cultura de meristemas, de cultura de anteras e de ápices caulinares (Canhoto, 1994; Canhoto & Cruz, 1996).

A embriogénese somática tem demonstrado mais vantagens e resultados positivos em comparação com as outras técnicas de propagação *in vitro*. A partir deste método é possível obter um grande número de plantas (Canhoto & Cruz, 1994) e clonar genótipos de interesse (Stefanello *et al.*, 2005). Porém, o aparecimento de um elevado número de embriões anómalos que, por sua vez, condiciona o sucesso de regeneração por este método é uma das limitações do processo (Canhoto & Cruz, 1996).

Na feijoa, a indução é feita normalmente em embriões zigóticos maduros e os embriões somáticos surgem directa ou indirectamente na zona cotiledonar no lado adaxial. A origem dos embriões pode ser unicelular (célula epidérmica ou subepidérmica) ou pluricelular (células meristemáticas), sendo esta via a mais comum (Cruz *et al.*, 1990; Canhoto *et al.*, 1996).

## **1.6. Embriogénese somática em Solanáceas**

A família Solanaceae é constituída por cerca de 95 géneros, que incluem cerca de 2000 espécies.

Tal como as mirtáceas, algumas solanáceas são plantas arbustivas ou arbóreas, distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Esta família engloba um grande número de espécies frutícolas e com elevado interesse económico como *Chyphomandra betacea*, *Nicotiana tabacum* e *Solanum melongena*.

Muitos membros desta família foram submetidos a ensaios de cultura *in vitro* por organogénese tais como, *Atropa belladonna*, *Petunia*, *Physalis minima*, *Solanum carolinense*, *Solanum melongena*, bem como através de cultura de anteras como é o caso de várias espécies dos géneros *Datura* e *Nicotiana*. Os resultados foram promissores, no entanto, como já foi mencionado anteriormente há uma série de vantagens associadas à embriogénese somática.

A primeira aplicação de micropropagação *in vitro* via embriogénese somática é relatada em *Nicotiana tabacum*, seguindo-se ensaios *Solanum melongena* (ver Guimarães *et al.*, 1988).

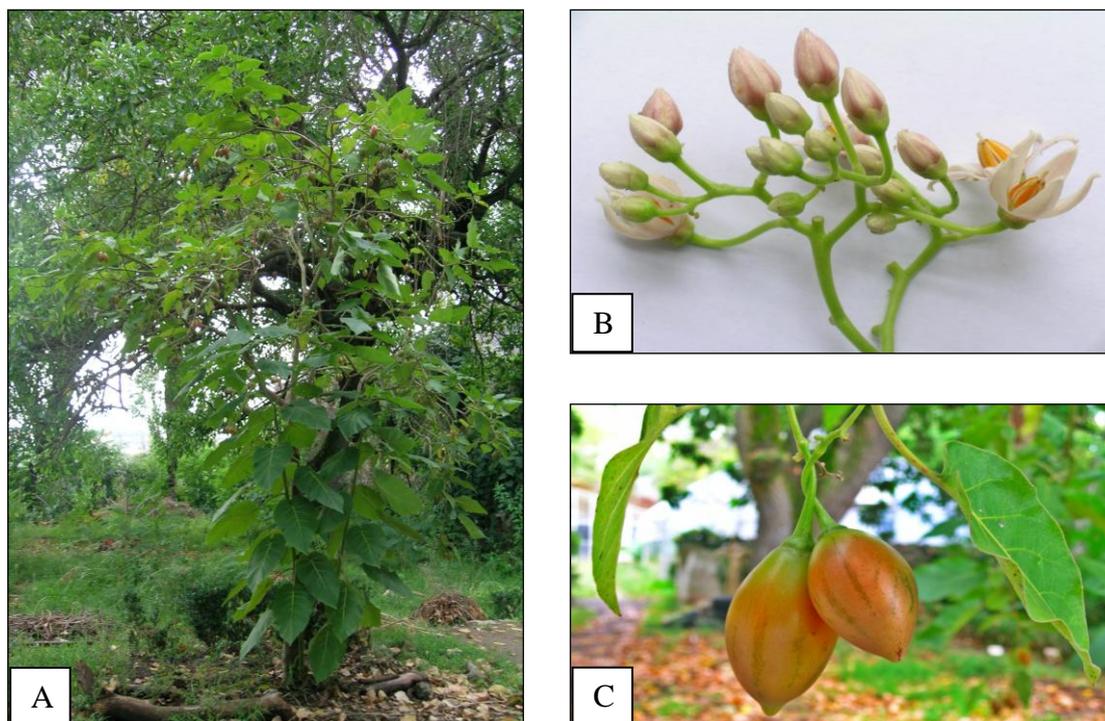
### **1.6.1. *Chyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. - Tamarilho**

#### **1.6.1.1. Caracterização e distribuição da espécie**

*Chyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. faz parte da família Solanaceae. É vulgarmente conhecida como tamarilho, tomate-arbóreo ou *tomate de la paz*. A designação de tamarilho surgiu em 1967, na Nova Zelândia, na sequência do aumento da produção e consumo que levou à necessidade de comercialmente ter um nome mais atractivo (Carloto, 2000).

À semelhança da feijoa, o tamarilho é uma espécie originária da América do Sul (das regiões Andinas do Peru, Chile, Equador e Bolívia). Actualmente a distribuição do tamarilho é mundial sendo a Nova Zelândia o país que mais produz e exporta este fruto (Correia *et al.*, 2010).

Trata-se de uma pequena árvore (Fig. 4) cuja altura varia entre 2-4m. As suas folhas são perenes, com 10-30cm de comprimento e de cor verde. O período de floração (Fig.4), em Portugal, ocorre de Agosto a Outubro. As flores são hermafroditas, rosadas, perfumadas e normalmente desenvolvem-se em pequenos grupos, nas extremidades dos ramos. Os frutos (Fig. 4) surgem, em Portugal, de Outubro a Abril, possuem um longo pedúnculo, podendo surgir isoladamente ou em conjuntos de 3-12 unidades. Têm uma forma oval pontiaguda em ambas as extremidades, estando o seu comprimento compreendido entre 5-10cm e largura 3-5cm. A cor do fruto maduro é variada podendo ser vermelho-escuro, laranja, amarelado ou uma mistura de cores. As sementes são achatadas, duras e de cor amarelo-alaranjado (Lopes *et al.*, 2000; Canhoto *et al.*, 2005; Correia *et al.*, 2010).



**Figura 4** – Características morfológicas de *Chyphomandra betacea* (Jardim Botânico da Universidade de Coimbra). A - Árvore de tamarilho; B – Botões florais e flores abertas; C – Frutos quase maduros

#### 1.6.1.2. Interesse da espécie

O tamarilho possui frutos comestíveis que podem ser ingeridos frescos ou cozinhados. A polpa é consistente e succulenta tendo um sabor agridoce (os frutos do tipo amarelo são os mais doces). Além do paladar, o tamarilho é uma excelente fonte de vitamina C e E, provitamina A e minerais (potássio e fósforo). O conteúdo em hidratos de carbono é baixo, tendo assim um reduzido valor calórico.

#### 1.6.1.3. Multiplicação vegetativa convencional versus *in vitro* de tamarilho

A multiplicação vegetativa convencional do tamarilho faz-se através de sementes ou estacaria. As sementes produzem árvores erectas de ramos altos, enquanto que a estacaria potencia o desenvolvimento de plantas de menor porte e com ramos pendentes. É de salientar que esta espécie não tolera o frio nem períodos de seca extrema. O tamarilho é consideravelmente resistente a pragas, porém, ocasionalmente pode ser atacada por afídeos verdes, moscas da fruta e, também, pelo vírus do mosaico da batata ou do pepino.

Relativamente à multiplicação vegetativa *in vitro* há registo de ensaios de micropropagação pela via da organogénese, cultura de meristemas e embriogénese somática. A androgénese, suspensões celulares e protoplastos também têm sido alvo de estudo (Canhoto *et al.*, 2005).

A formação de embriões somáticos em tamarilho tem origem no hipocótilo de embriões zigóticos, nomeadamente nas células meristemáticas, ou seja, origem multicelular. Os explantes, por norma, mais utilizados na indução de embriogénese somática são as folhas, deste modo a é embriogénese indirecta com formação de calo (Canhoto *et al.*, 2005).

### **1.7. Objectivos**

A embriogénese somática tem-se revelado como um método de micropropagação altamente eficaz no sentido de permitir a produção de um grande número de plantas num curto espaço de tempo e não ser necessário proceder ao enraizamento do explante, ao invés do que se verifica noutras técnicas de propagação.

Contudo, a percepção de todos os mecanismos envolvidos na embriogénese somática está relativamente longe de ser atingida. Este processo, ao longo de vários ensaios experimentais ainda demonstra originar um elevado número de embriões anómalos, falta de sincronização das fases durante o desenvolvimento embrionário, germinação precoce dos embriões, ocorrência de variação somaclonal e baixa taxa de conversão em plântulas.

As limitações acima referidas tendem sucessivamente a ser optimizadas do modo a tornar a micropropagação *in vitro* via embriogénese somática cada vez mais eficiente e, conseqüentemente mais proveitosa em termos biotecnológicos.

Todas as etapas de embriogénese somática principalmente a indução, procedimento crucial para que o desenvolvimento embrionário, se processe do melhor modo até ao aparecimento de uma nova plântula, têm sido controladas e estabelecidas, ao longo de décadas, por tentativa-erro no que respeita à constituição do meio de cultura, tipo de explante e condições de cultura.

Este trabalho tem como principal objectivo optimizar o processo de embriogénese somática, tendo em vista reduzir ou eliminar as limitações ainda presentes neste processo e, conseqüentemente aumentar o nível de conhecimento associado ao mesmo.

Para isso procedeu-se à realização de vários ensaios fazendo variar a constituição do meio de cultura, as condições de cultura, bem como o estado do material inoculado.

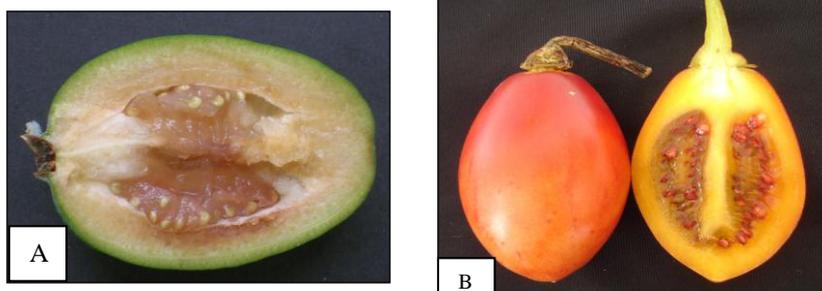
As substâncias de reserva (lípidos, proteínas e amido total) foram histoquimicamente observadas e bioquimicamente quantificadas em embriões zigóticos e somáticos em fase cotiledonar de *Feijoa sellowiana* Berg. e *Chyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (espécies lenhosas), de modo a tentar perceber de que forma a variação da acumulação de substâncias de reserva nos embriões, está relacionada com as fases anteriores e posteriores, de desenvolvimento embrionário e de conversão numa nova plântula, respectivamente.

Este trabalho insere-se num objectivo mais vasto que visa o melhoramento das duas espécies estudadas neste trabalho em particular o estabelecimento de protocolos eficazes de clonagem.

## 2. MATERIAIS e MÉTODOS

### 2.1. Material vegetal

O material vegetal utilizado em todos ensaios realizados foi proveniente das árvores de feijoa e de tamarilho existentes no Jardim Botânico da Universidade de Coimbra, Portugal. A partir dos frutos maduros destas árvores (Fig.5) obtiveram-se as sementes, das quais se isolaram os embriões zigóticos maduros utilizados na indução de embriogénese somática, bem como para a sua preservação.



**Figura 5** – Cortes longitudinais de frutos de feijoa (A) e de tamarilho (B) mostrando as sementes.

### 2.1.1. Recolha e preservação de embriões zigóticos de feijoa e de tamarilho

Os frutos maduros de feijoa e de tamarilho foram recolhidos e utilizados para a extracção das sementes, ou mantidos no frio (4°C) durante alguns dias até à sua utilização. Após a lavagem dos frutos com água, as sementes foram retiradas e esterilizadas, sendo colocadas numa solução de hipoclorito de cálcio 7% (p/v) com 2-3 gotas de Tween, durante 20 minutos e, seguidamente, passadas três vezes por água esterilizada bidestilada, já no interior da câmara de fluxo. As sementes podiam ser utilizadas no momento para extracção de embriões zigóticos ou deixadas secar à temperatura ambiente para utilização ulterior.

Todos os procedimentos ocorreram numa câmara de fluxo, em condições assépticas, de forma a evitar contaminações fúngicas ou bacterianas. Os instrumentos utilizados neste procedimento, bisturis, agulhas, e pinças, foram frequentemente passadas pela chama após imersão em etanol a 95% (v/v).

Os embriões zigóticos de feijoa e de tamarilho foram cuidadosamente isolados com o auxílio de agulhas e lupa, no interior da câmara de fluxo. Durante este processo procurou-se evitar danificar os embriões, tendo sido apenas utilizados embriões intactos com os cotilédones completamente desenvolvidos.

No decorrer da extracção, os embriões zigóticos de ambas as espécies eram colocados em caixas de Petri com água esterilizada bideslilada. No fim de cada processo de isolamento, os embriões foram colocados em papel de filtro esterilizado para retirar o excesso de água, pesados e envoltos em papel de alumínio, imersos em azoto líquido e rapidamente transferidos para um *biofreezer* a -80°C. Este procedimento foi aplicado para os ensaios bioquímicos de quantificação de substâncias de reserva. Para os ensaios histoquímicos, morfológicos e fisiológicos, os embriões zigóticos foram utilizados frescos, ou seja, isolados no próprio dia em que se iniciou o protocolo.

## 2.2. Indução de embriogênese somática em feijoa e em tamarilho

### 2.2.1. Preparação dos meios de cultura

#### 2.2.1.1. Feijoa

Durante este trabalho foi utilizado meio de cultura base MS (Murashige & Skoog, 1962), cuja composição está representada na tabela 1. A este meio adicionou-se um regulador de crescimento, 1mg/L de auxina 2,4-D, e 9% (p/v) sacarose.

O meio base MS foi preparado a partir de soluções stock concentradas: macronutrientes (solução 20x concentrada), micronutrientes (solução 100x concentrada), Fe-EDTA (solução 40x concentrada), *bio*-inositol (solução 50x concentrada), vitaminas e outros compostos orgânicos (solução 50x concentrada). As soluções stock de macronutrientes e de Fe-EDTA são mantidas, em laboratório, a 4°C e as restantes soluções a -18°C, bem como a auxina 2,4-D. A sacarose permanece à temperatura ambiente, sendo pesada e adicionada no momento da preparação dos meios.

Após a adição dos constituintes do meio de cultura para indução de embriogênese somática, o pH do meio foi ajustado para valores entre 5,6 e 5,8, utilizando-se soluções 0,1-1,0N de KOH e/ou HCl. Posteriormente adicionou-se agar na concentração de 0,7% (p/v). Com a adição de água bidestilada fez-se o volume de meio desejado. Após a dissolução do agar, por aquecimento, o meio foi distribuído por tubos de ensaio numa quantidade aproximada de 15 ml/tubo. Os tubos foram rolhados com algodão envolto em gaze e posteriormente autoclavados a uma temperatura de 121°C e a uma pressão de 1 atm., durante 20 minutos.

#### 2.2.1.2. Tamarilho

A indução de embriogênese somática no tamarilho foi indirecta, isto é, inicialmente foi necessário induzir calos embriogénicos a partir de um explante, neste caso folhas jovens, que por sua vez originaram embriões somáticos após transferência para um meio sem auxinas. Os calos embriogénicos podem ser mantidos durante vários anos, sendo periodicamente o meio de cultura renovado.

Durante a realização deste trabalho não foi necessário iniciar todo o processo de embriogênese somática *in vitro*, tendo-me sido cedido calo embriogénico, cuja indução inicial através das folhas jovens foi realizada em Fevereiro de 2008.

Para continuar a manutenção/preservação de calo embriogénico foi utilizado meio de cultura base MS, cuja composição está representada na tabela 1. A este meio adicionou-se um regulador de crescimento, 5mg/L da auxina picloram, e 9% (p/v) de sacarose. Tal como referido acima, o meio de cultura do calo embriogénico necessita de ser renovado de aproximadamente oito em oito semanas.

Para permitir, a partir de calo embriogénico, a formação de embriões somáticos de tamarilho foi utilizado meio de cultura base MS, cuja composição também se encontra representada na tabela 1. A este meio acrescentou-se 2mg/L de ABA e 4% (p/v) sacarose.

O procedimento decorreu como o descrito na secção 2.2.1.1.. No entanto, ao invés do que ocorre durante a preparação do meio de indução para feijoa, adicionou-se fitagel na concentração de 2,5g/L em vez de agar. A cultura foi realizada e mantida em frascos.

**Tabela 1** – Composição do meio MS (Murashige & Skoog, 1962)

<b>Nutrientes (mg/l)</b>	
<b>Macronutrientes</b>	
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
KNO <sub>3</sub>	1900
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
<b>Micronutrientes</b>	
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
KI	0,83
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,3
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37,3
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6
<b>Orgânicos</b>	
Ácido nicotínico	0,5
Glicina	2
Mio-inositol	100
Piridoxina – HCl	0,5
Tiamina – HCl	0,1

### 2.2.2. Recolha e esterilização de sementes de feijoa e tamarilho

Os frutos maduros de feijoa foram recolhidos e utilizados para extração das sementes, ou mantidos no frio (4°C) durante alguns dias até à sua utilização. Após a

lavagem dos frutos com água, as sementes foram retiradas e esterilizadas, sendo colocadas numa solução de hipoclorito de cálcio 7% (p/v) com 2-3 gotas de Tween, durante 20 minutos e passadas três vezes por água esterilizada bidestilada, já no interior da câmara de fluxo. As sementes podiam ser utilizadas no momento para extracção e inclusão de embriões zigóticos em meio de cultura ou deixadas secar à temperatura ambiente para armazenamento em stock.

### **2.2.3. Extracção e inoculação em meio de indução de embriões zigóticos em feijoa e de calo embriogénico em tamarilho**

Todos os procedimentos, associados à iniciação da cultura, ocorreram numa câmara de fluxo, em condições assépticas, de forma a evitar contaminações por microrganismos.

#### **2.2.3.1. Feijoa**

Os embriões zigóticos de feijoa foram cuidadosamente removidos das sementes com o auxílio de agulhas e lupa, no interior da câmara de fluxo. Durante este processo procurou-se evitar danificar os embriões, tendo sido apenas utilizados embriões intactos com os cotilédones completamente desenvolvidos. Os embriões zigóticos de feijoa foram inoculados inteiros em tubos de ensaio (2 embriões/tubo), em meio MS, com 1mg/L de 2,4-D e 9% de sacarose.

#### **2.2.3.2. Tamarilho**

No calo embriogénico de tamarilho, apenas as partes menos oxidadas, foram metodicamente retiradas com o auxílio de uma ansa de inoculação, no interior da câmara de fluxo. O calo embriogénico de tamarilho foi inoculado em frascos (4 agregados celulares/frasco), em meio MS, com 2mg/L de ABA e 9% de sacarose.

### **2.2.4. Condições de cultura de feijoa e de tamarilho**

Ambos os tipos de culturas, embriões zigóticos de feijoa e calo embriogénico de tamarilho, foram mantidas em estufa, às escuras e sob uma temperatura de  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , durante aproximadamente 10 e 3 semanas, respectivamente.

Após o período de indução de embriogénese somática, os explantes (embriões somáticos e material embriogénico de feijoa (10 semanas) e de tamarilho (3 semanas) foram, com o auxílio de uma lupa, observados e apenas os embriões somáticos que se encontravam em fase cotiledonar madura foram aproveitados para os ensaios que se seguem. Uma parte deste material, cerca de 1,8g, foi imersa imediatamente após a extracção em azoto líquido e armazenada no *biofreezer* a -80°C para posterior utilização em estudos bioquímicos, e a outra parte, material fresco, utilizada para estudos histoquímicos, morfológicos e fisiológicos.

### **2.3. Quantificação e análise histoquímica de substâncias de reserva em embriões zigóticos e somáticos de feijoa e de tamarilho**

#### **2.3.1. Quantificação de substâncias de reserva**

##### **2.3.1.1. Preparação dos embriões zigóticos e somáticos**

Para a análise histoquímica as amostras têm que ser frescas. Deste modo, para a recolha dos embriões zigótico de feijoa e de tamarilho procedeu-se como está descrito na secção 2.1.1. desde capítulo. Para a colheita dos embriões somáticos de ambas as espécies, feijoa e tamarilho, realizaram-se os procedimentos explicitados na secção 2.2.4., também deste capítulo.

##### **2.3.1.2. Quantificação de lípidos totais**

Antes de dar início ao protocolo propriamente dito, é de salientar que todas as amostras, inicialmente congeladas, foram liofilizadas processo este que decorreu durante aproximadamente 24h. Deste modo, todo o procedimento passou a ser executado com material seco.

A quantificação de lípidos totais foi efectuada em quatro amostras distintas: embriões zigóticos de feijoa; embriões somáticos de feijoa; embriões zigóticos de tamarilho; e embriões somáticos de tamarilho. Em cada tipo de amostra procedeu-se individualmente à extracção e quantificação três vezes, de modo a sustentar os resultados (n=3).

Para análises espectrofotométricas é imprescindível a realização de uma curva padrão que, neste caso, foi elaborada com soluções padrão de colesterol entre 0,1-1,2 mg/ml.

#### 2.3.1.2.1. Extracção de lípidos totais

Para a realização da extracção de lípidos totais, pesou-se três vezes 2,5 mg de cada amostra e colocou-se em tubos de centrífuga de 12ml com tampa. A todas as amostras juntou-se 7ml de clorofórmio:metanol (2:1;v/v) e agitou-se durante 1min. no vórtex. As amostras ficaram em repouso durante 2h, com agitação de 1min. em cada 30min.

Centrifugaram-se todas as amostras durante 1min., a 3000 rpm e, em seguida, procedeu-se à limpeza das paredes dos tubos para retirar possíveis partículas aderentes, voltando a centrifugar-se as amostras durante 10min. para separar as partículas do extracto lipídico.

Transferiu-se 5ml do extracto lipídico de cada amostra para um novo tubo com 1ml de solução 0,9% de cloreto de sódio e agitou-se durante 1 min., voltando a centrifugar-se todas as amostras durante 10 min., a 3000 rpm.

Em seguida, removeu-se e rejeitou-se a fase superior aquosa com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e lavaram-se as paredes de cada tubo, duas vezes, com 1ml de solução clorofórmio:metanol:água (3:48:47; v/v/v). Esta solução de limpeza foi posteriormente removida.

Evaporaram-se todas as amostras até à secura numa estufa com vácuo a 45°C e, também, no evaporador rotativo para que o procedimento ocorresse mais rapidamente. Depois, transferiu-se o resíduo com 2 ml de clorofórmio para um frasco (4ml) com rolha, voltando a evaporar-se as amostras até à secura numa estufa com vácuo (a 45°C) e, também, no evaporador rotativo.

Por último, redissolveu-se o resíduo num 1ml de clorofórmio e as amostras foram mantidas a -20°C até se proceder à análise quantitativa.

É de salientar o facto de ter de ser feita uma amostra em branco (sem conter o extracto lipídico), pelo menos uma para cada tipo de amostra segundo o mesmo procedimento.

## 2.3.1.2.2. Quantificação de lípidos totais – análise espectrofotométrica

Este método de quantificação de lípidos totais tem por base a reacção de produtos da degradação dos lípidos com os aldeídos aromáticos, o que resulta numa coloração vermelha e que pode ser quantificada a 528nm (Zöllner & Kirsch, 1962).

Colocou-se 100µl do extracto lipídico de cada amostra, incluindo as amostras em branco, em tubos de 12 ml (com tampa) e em seguida evaporou-se o solvente numa estufa de vácuo a 45°C.

Adicionou-se 200µl de ácido sulfúrico a cada amostra e agitou-se durante 1min., no vórtex (Tab.2). Taparam-se todos os tubos e aqueceram-se num banho de água por 10min., à temperatura de 100°C (Tab.2). Deixou-se arrefecer por 5min. num banho de água a 20°C (Tab.2). Posteriormente, juntou-se 2,5 ml do reagente ácido fosfórico-vanilina (20ml a 0,6% (p/v) de solução de vanilina adicionando-se ácido fosfórico a 85% até perfazer 100ml de solução) e agitou-se mais uma vez todas as amostras durante 1min. (Tab.2).

Mediu-se a absorvância a 528nm no espectrofotómetro (programa Cintral) (Tab.2), depois das amostras se encontrarem em repouso e no escuro durante 60-65min. (Tab.2). O conteúdo em lípidos foi calculado como equivalentes de colesterol pela absorvância lida na amostra e curva padrão.

Apesar do processo de quantificação de lípidos totais parecer simples, a verdade é que este método é extremamente metuculoso e metódico, principalmente no que respeita ao tempo em que as reacções decorrem. O atraso de minutos ou até segundo pode alterar todos os resultados obtidos. Deste modo, aconselha-se a realização de um tabela que permita conciliar o número de amostras com o tempo das reacções (Tab.2).

**Tabela 2** - Discriminação das diferentes etapas associadas à quantificação dos lípidos totais.

Etapas Amostras	Etapas							Pausa	7
	1	2	3	4	5	6			
<b>Branco A</b>	-	-	11h40	11h47	11h57	12h02	12h07	<b>13h07</b>	
<b>A<sub>1</sub></b>	-	-	11h40	11h47	11h57	12h07	12h12	<b>13h12</b>	
<b>A<sub>2</sub></b>	-	-	11h40	11h47	11h57	12h12	12h17	<b>13h17</b>	
<b>A<sub>3</sub></b>	-	-	11h40	11h47	11h57	12h17	12h22	<b>13h22</b>	

### 2.3.1.3. Quantificação de proteínas totais

A quantificação de proteínas totais foi efectuada em quatro amostras: embriões zigóticos de feijoa; embriões somáticos de feijoa; embriões zigóticos de tamarilho; e embriões somáticos de tamarilho. Em cada tipo de amostra procedeu-se individualmente à extracção e quantificação três vezes, de modo a sustentar os resultados (n=3).

Para análises espectrofotométricas é imprescindível a realização de uma curva padrão que, neste caso, foi elaborada com soluções padrão de albumina bovina do soro entre 0,1-1µg/ml.

#### 2.3.1.3.1. Extracção de proteínas totais

Para a extracção de proteínas totais foi utilizado um tampão de extracção constituído por 50mM de citrato de sódio (pH 5.5), 5% de SDS (m/v), 0,01% de BSA (m/v), 150mM de cloreto de cálcio e 2% de β-mercaptoetanol. É de realçar o facto de o β-mercaptoetanol ter sido adicionado aquando o início do procedimento experimental, deste modo os restantes constituintes do tampão de extracção podem ser armazenados a -20°C para ser utilizado em ensaios posteriores. A relação entre amostra/tampão de extracção é para 50mg de amostra adiciona-se 100µl de tampão.

As quatro amostras, cada amostra com 300mg (peso fresco), foram maceradas em almofarizes distintos com auxílio de um pilão, em azoto líquido (4°C), até ficarem em pó. Posteriormente, com uma colher com capacidade para 100mg, cada amostra inicial foi dividida por três *eppendorfs* (n=3).

Adicionaram-se a cada amostra 200µl de tampão de extracção de proteínas e juntaram-se 4µl de β-mercaptoetanol e 3,5µl cocktail inibidor de proteases (SIGMAFAST™ Protease Inhibitor), cuja relação amostra/composto é para 300mg de amostra fresca 10µl de composto. Macerou-se intensivamente com um pistão a mistura contida em cada amostra.

Centrifugaram-se, todas as amostras, durante 30min., a 13200 r.p.m.. Após a centrifugação, o sobrenadante de cada amostra foi transferido para um novo *eppendorf*, sendo colocado imediatamente num recipiente com gelo. Contudo, se a quantificação de proteínas totais não for feita de imediato, é aconselhável e possível conservar as amostras a -80°C, depois de imersas em azoto líquido.

### 2.3.1.3.2. Quantificação de proteínas totais – análise espectrofotométrica

O método de quantificação de proteínas totais tem como base o protocolo de Bradford (1976). A partir deste protocolo é possível quantificar um grande número de amostras, num curto espaço de tempo. O processo baseia-se na observação de que o *Coomassie Brilliant Blue G-250* existe em duas formas de cor diferente, vermelho e azul. O vermelho é convertido a azul na ligação do corante à proteína.

Foi efectuada uma solução stock de Bradford constituída por 1,63 ml de etanol a 97% (v/v), 3,37ml de ácido fosfórico e 5,7mg de *Coomassie Brilliant Blue G-250*. Desta solução stock foram retirados 15 ml, adicionando-se 212 ml de água bidestilada, 15,5ml de ácido fosfórico e 7,5ml de etanol a 97% (v/v), perfazendo deste modo 250 ml de volume, de solução Bradford final.

Iniciando-se o processo de quantificação propriamente dito, diluiu-se 1µl de todas as amostras com extracto proteico em 199 µl de água bidestilada. Da diluição, retirou-se 100 µl de cada amostra e juntou-se 1ml da solução Bradford final. Foi também realizada uma amostra em branco que continha 100 µl de água bidestilada e 1ml da solução Bradford final.

Um pormenor interessante e importante é que os 100 µl de cada amostra diluída foram colocados na tampa do *ependorf* respectivo, sendo o mililitro de solução Bradford de final colocado no interior do *ependorf*. A tampa de cada amostra foi fechada de 1 em 1min., com agitação no vortex. Este facto prende-se com o tempo de reacção que se segue (15 min.) e com o tempo de leitura da absorvência no espectrofótopmetro.

Passados os 15min. de reacção, e com a calibração do espectrofótopmetro com a amostra em branco, procedeu-se sequencialmente à leitura da absorvência de cada amostra a 595nm.

### 2.3.1.4. Quantificação de amido total

Tal como nos casos anteriores a quantificação de amido total foi realizada em quatro amostras diferentes: embriões zigóticos de feijoa; embriões somáticos de feijoa; embriões zigóticos de tamarilho; e embriões somáticos de tamarilho. Em cada tipo de amostra procedeu-se individualmente à extracção e quantificação três vezes, de modo a sustentar os resultados (n=3).

A curva padrão foi executada com soluções padrão de amido solúvel (SIGMAFAST™ Soluble Starch S9765) entre 0-0,01mg/μl, a partir de uma solução stock de 1g/100ml. Em cada amostra padrão foram colocados 100μl de solução padrão de amido solúvel, na respectiva concentração e perpez-se com 1 ml de soluto de Lugol. A solução de Lugol (100ml) foi preparada adicionando-se 10g de iodo de potássio, 5g de iodo e perpez-se com de água bidestilada até 100ml.

#### 2.3.1.4.1. Extração de amido total

As quatro amostras, cada amostra com 300 mg (peso fresco), foram maceradas em almofarizes distintos com auxílio de um pilão, em azoto líquido (4°C), até ficarem em pó. Posteriormente, com uma colher com capacidade para 100 mg, cada amostra inicial foi dividida por três *ependorfs* (n=3).

Adicionou-se a cada amostra 2ml de metanol:clorofórmio:água (12:5:3 v/v/v). Macerou-se intensivamente com um pistão a mistura contida em cada amostra. Em seguida, as amostras foram centrifugadas durante 10 min., a 2000 rpm. O sobrenadante (S1) de cada amostra foi removido para outro *ependorf* e às amostras foram novamente adicionados 2 ml de metanol:clorofórmio:água (12:5:3 v:v:v), com nova centrifugação, nas condições referida anteriormente. O sobrenadante (S2) foi descartado e adicionado a S1.

Aos *pellets* resultantes de cada amostra foi adicionado 1ml de ácido perclórico a 30% (v/v). Em seguida todas as amostras foram centrifugadas durante 15 min., a 10.000 rpm. O sobrenadante com amido foi removido para um novo *ependorf*. Com a adição de ácido perclórico 30% o amido é libertado para o sobrenadante. Estas três últimas etapas foram executadas três vezes consecutivas, e delas resultaram três sobrenadantes de cada amostra que foram sendo acumulados num mesmo *ependorf*, respectivamente. Cada amostra fica então, aproximadamente, com 3ml de ácido perclórico 30% mais amido.

Os sobrenadantes S1 e S2, que possivelmente contêm açúcares livres foram preservados a -20°C para posteriores ensaios em vista. Os sobrenadantes com amido foram utilizados no processo de quantificação de amido total e o restante ficou também preservado a -20°C, para outros possíveis ensaios.

#### 2.3.1.4.2. Quantificação de amido total – análise espectrofotométrica

A solução de soluto de Lugol é por norma utilizada para identificar amido. Esta solução é inicialmente amarela e quando se agrega às moléculas de amido adquire uma tonalidade azul-violácea.

Adicionou-se 0,5 ml de cada amostra (sobrenadante com amido) a 1 ml de soluto de Lugol a 0,2%. Durante esta etapa realizou-se a preparação da amostra em branco constituída por 0,5 ml de ácido periódico 30% e 1 ml de soluto de Lugol. O soluto de Lugol foi colocado no interior do *ependorf*, enquanto que a amostra na tampa do mesmo. As tampas foram sendo fechadas de 1 em 1min. de modo a todas as amostras terem o mesmo tempo de reacção. Esta técnica tem como objectivo minimizar o erro de leitura no espectrofotómetro. Procedeu-se, então, à leitura dos valores de absorvância a 490nm, no espectrofotómetro já calibrado.

Tanto o procedimento de extracção como o de quantificação de amido total foram adaptados do protocolo estabelecido por McCready *et al.* (1950).

### 2.3.2. Análise histoquímica de substâncias de reserva

#### 2.3.2.1. Preparação dos embriões zigóticos e somáticos

Para a análise histoquímica as amostras têm que ser frescas. Deste modo, para a recolha dos embriões zigótico de feijoa e de tamarilho procedeu-se como está descrito na secção 2.2.1. desde capítulo. Para a colheita dos embriões somáticos de ambas as espécies, feijoa e tamarilho, realizaram-se os mecanismos explicitados na secção 2.2.2.4., também, deste capítulo.

#### 2.3.2.2. Fixação, pós-fixação e desidratação

Os embriões maduros foram fixados numa solução de glutaraldeído 2,5% (v/v) em tampão cacodilato de sódio (0,1M; pH=7,2), ou seja, numa proporção de 1:9, adicionando-se uma gota de cloreto de cálcio anidro (0,01M) por cada 5ml de fixador. Os explantes foram mantidos no fixador durante cerca de 1-1,5 h à temperatura ambiente.

Seguidamente, o material foi submetido a três lavagens consecutivas, 15min. cada, em tampão cacodilato (0,1M; pH=7,2).

Procedeu-se à pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1% (p/v) preparado no mesmo tampão, durante 2 hora, à temperatura ambiente. Após três novas lavagens, 15 min. cada, com tampão cacodilato (0,1M; pH=7,2), os embriões foram desidratados recorrendo a uma série ascendente de etanol 70-100% (v/v), durante 10min. em cada etapa.

### **2.3.2.3 Impregnação e realização de cortes semi-finos**

A realização de estudos histoquímicos requereu a inclusão prévia do material em blocos de resina Spurr. A polimerização dos blocos, com os embriões devidamente orientados, foi realizada a 60°C, durante 12h.

As secções (0,5-1µm) foram obtidas com facas de vidro num ultramicrotomo e colocadas sobre as lamelas com água bidestilada, a secar na estufa a 60°C pelo menos durante 1h.

### **2.3.2.4 Colorações**

#### **2.3.2.4.1. Coloração de lípidos – negro de Sudão B**

Antes de dar início ao processo de coloração o corante de Negro de Sudão B deve ser filtrado e mantido num recipiente fechado, na estufa a 60°C, durante 30min.

A coloração foi iniciada com a adição de umas gotas de corante de Negro de Sudão B a 0,3% (p/v), sobre as lâminas com as amostras. Esta etapa durou cerca de 2h, à temperatura ambiente. Sequencialmente, procedeu-se à lavagem ligeira das amostras em álcool a 70% (v/v) para a diferenciação dos tecidos fixados e à lavagem em água bidestilada, durante 1-2min. (Bronner, 1975). As amostras ficaram a secar na estufa, à temperatura de 60°C.

#### **2.3.2.4.2. Coloração de proteínas – azul de mercúrio de bromofenol**

Com o intuito de remover a resina Spurr excedente nas amostras, colocou-se sobre cada lâmina umas gotas de solução alcoólica de hidróxido de sódio a 2% (p/v), durante 3-5min., à temperatura ambiente, logo de seguida procedeu-se à lavagem com água bidé

stilada. As lâminas foram colocadas em tinas com ranhuras, imersas em peridrol a 5% (v/v), durante 30 min. Procedeu-se à lavagem das amostras com água bidestilada, 3 vezes 5min. cada. Estas etapas não são propriamente de coloração mas de desosmificação do material.

Colocou-se o material com azul de mercúrio de bromofenol, à temperatura ambiente, durante 2h. Em seguida, lavaram-se as amostras em ácido acético a 0,5% (v/v), durante 5-10min., e, posteriormente, em água corrente cerca de 5min (Mazia, 1953). As amostras ficaram a secar na estufa, durante 12h, à temperatura de 60°C.

#### 2.3.2.4.3. Coloração de amido – ácido periódico/reagente de Schiff (PAS)

As amostras foram, inicialmente, mergulhadas em tinas com ranhuras que continham solução alcoólica de ácido periódico a 1% (v/v), durante 20min., à temperatura ambiente. Sequencialmente, procedeu-se à passagem das amostras em álcool a 70% (v/v) e à lavagem em água bidestilada (duas vezes).

Imediatamente após as lavagens, as amostras foram mergulhadas em tinas com ranhuras que continham reagente de Schiff, às escuras, à temperatura ambiente, cerca de 4h. Por último, as lâminas foram passadas por água corrente, durante 15min. e colocadas a secar na estufa, durante um dia, à temperatura de 60°C (McManus, 1946).

#### 2.3.4.5. Análise de substâncias de reserva ao microscópio óptico composto

Após os procedimentos histoquímicos, referidos nos pontos anteriores, terem sido realizados, as secções histológicas com os cortes semi-finos estão prontas para poderem ser estudadas com o auxílio de um microscópio óptico composto. O material foi analisado e fotografado com a câmara em várias ampliações, desde 40x a 100x em imersão.

## 2.4. Efeito do estado do material inoculado na indução de embriogénese somática, em feijoa

Este ensaio teve como objectivo testar a indução de embriogénese somática, via directa em feijoa, fazendo variar o estado do material inoculado. Deste modo, foram inoculados em meio de indução embriões zigóticos (ez), sementes com cortes apenas ao nível do tegumento (sc) e sementes intactas (s), durante 8 semanas (Fig.6).

A preparação do meio de indução de embriogénese somática (meio MS, com 1mg/L 2-4,D e 9% sacarose), bem como a preparação do material em estudo encontram-se descritas nas secções 2.1 e 2.2 deste capítulo.

13 tubos/ 26 <b>ez</b> (2 ez/tubo)	13 tubos/26 <b>sc</b> (2 sc/tubo)	13 tubos/26 <b>s</b> (2 s/tubo)
		
MS 2,4D 1mg/L 9% Sacarose <b>Escuro</b> 	MS 2,4D 1mg/L 9% Sacarose <b>Escuro</b> 	MS 2,4D 1mg/L 9% Sacarose <b>Escuro</b> 

**Figura 6** – Esquema representativo do ensaio experimental (secção 2.4.).

Foram efectuados registos quer quantitativos, quer qualitativos, acerca do desenvolvimento do material no fim do ensaio, semana 8.

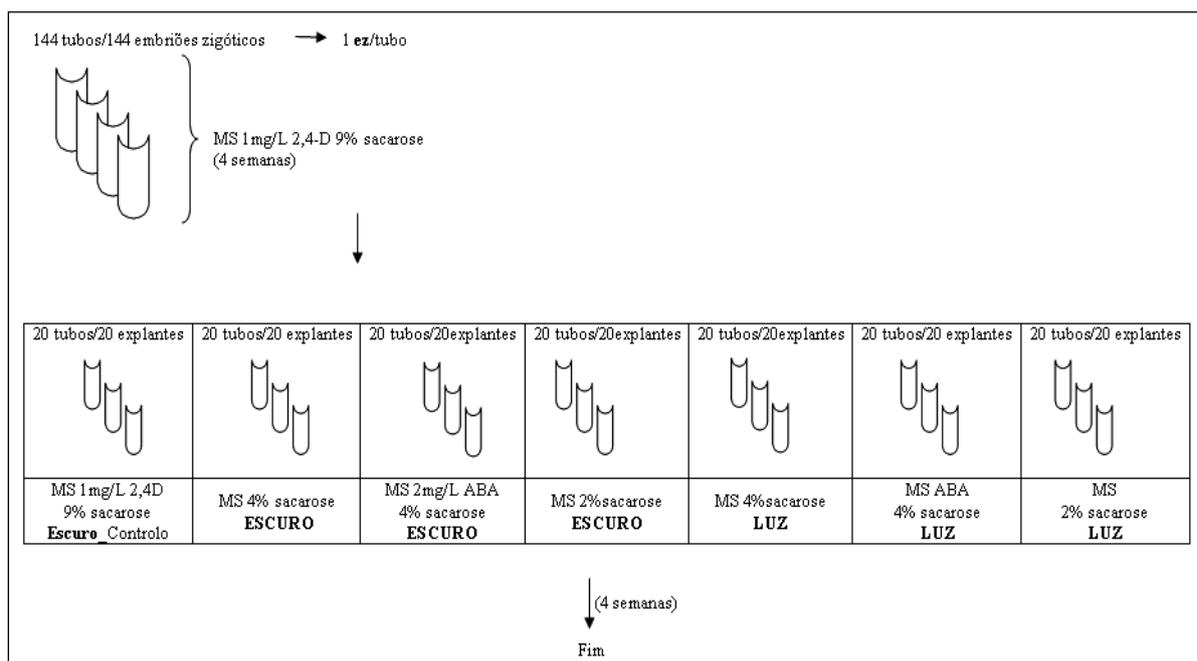
## 2.5. Efeito de condições de cultura e de meios de cultura da indução à conversão de embriões somáticos, em feijoa

### 2.5.1. Indução de embriões somáticos

Esta experiência teve como objectivo primordial estudar a capacidade de induzir embriogénese somática, através embriões zigóticos (via directa), em diferentes meios e condições de cultura, tais como: luz *vs* escuro; 4% sacarose *vs* 2% sacarose; e 2mg/L de ABA *vs* meio sem ABA.

A preparação do meio de indução de embriogénese somática (meio MS com suplementos), bem como a preparação do material em estudo encontram-se descritas nas secções 2.1 e 2.2 deste capítulo.

O ensaio decorreu em duas etapas consecutivas, 4 semanas cada, isto é, o tempo total da experiência foi de 8 semanas. O esquema que se segue facilita a percepção de todos os acontecimentos da indução (Fig.7).



**Figura 7** – Esquema representativo do ensaio experimental (secção 2.5.1.)

Para dar início a este ensaio foi necessário isolar e inocular em meio de indução MS com 1mg/L de 2,4-D e 9% sacarose, cerca de 144 embriões zigóticos (ez) de feijoa. Os explantes mantiveram-se durante as primeiras 4 semanas, no escuro a uma temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  (Fig.7).

Passadas as 4 semanas transferiram-se os explantes para três tipos de meio de indução distintos e duas condições de cultura também diferentes, de acordo com o representado na figura 7. Apenas o ensaio de controlo foi mantido em cultura continua. Os resultados foram qualitativa e quantitativamente analisados no fim da experiência.

É de extrema relevância salientar que mediante os resultados obtidos nesta experiência, houve uma repetição de um dos ensaios, em que os embriões que daí advieram foram sujeitos à análise de quantificação de substâncias de reserva, nomeadamente os lípidos, de acordo com o descrito na alínea 2.3.1.2..

### 2.5.2. Germinação de embriões somáticos e conversão em plântulas

Com base nos resultados obtidos no processo de indução de embriogénese somática em feijoa (secção 2.5.1.) foi importante testar a germinação e conversão dos embriões somáticos.

Para se obter a maturação e germinação de embriões somáticos de feijoa, bem como a conversão dos mesmos em plântulas, foi preparado um meio, designado por Meio E. Para a preparação de 1L deste meio foram necessários os seguintes constituintes: 20ml de solução de Knop, 20g de sacarose, 5ml de Fe-EDTA, 1ml de micronutrientes MS (Tab. - 1) sem IK, 4ml de vitaminas de Fossard. Depois da adição de todos os reagentes foi preciso ajustar o pH entre os 5,6 e 5,8, e adicionou-se 6g de agar. Após o aquecimento no meio de cultura, juntou-se 8g de carvão activado.

Os explantes obtidos no processo de indução de embriogénese somática em feijoa (secção 2.5.1.), foram transferidos para o Meio E, na câmara de fluxo e colocados em fotoperíodo a uma temperatura de  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , durante aproximadamente 10 semanas (Fig.8).

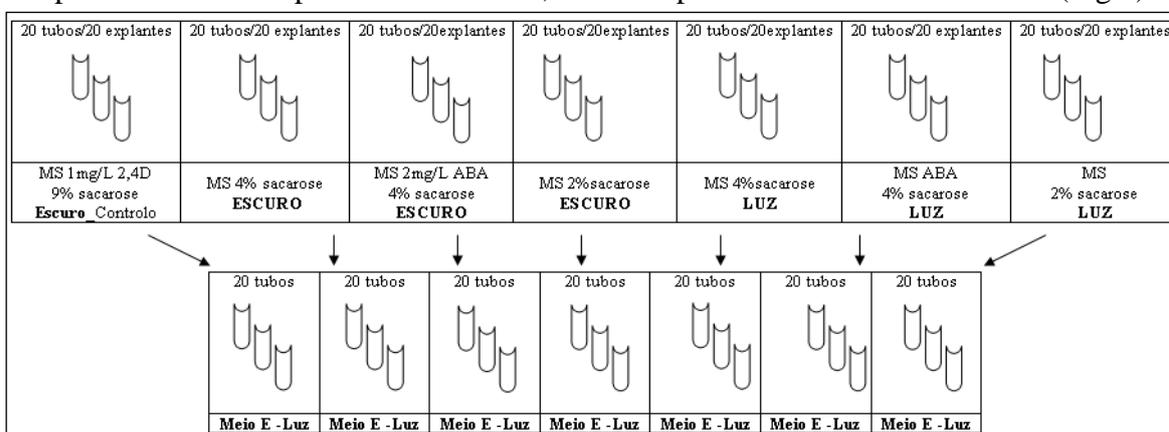


Figura 8 – Esquema representativo do ensaio experimental (secção 2.5.2.)

Após as 10 semanas de experiência, os resultados de cada ensaio foram fotografados e foram feitas contagens exaustivas do material em estudo, no interior da câmara de fluxo com o auxílio de uma lupa.

### 2.5.2.1. Parâmetros e método de contagem

Uma vez que este processo tem algum grau de subjectividade convém ter parâmetros bem definidos de análise., Deste modo, foram considerados os aspectos morfológicos de cada embrião ou plântula, o que no fundo revela o seu estado de desenvolvimento. As fases contabilizadas foram as seguintes: embriões somáticos (ES) com desenvolvimento da parte caulinar; ES com desenvolvimento da raiz; ES convertidos; ES anómalos germinados; ES cotiledonar maduros; e ES anómalos maduros.

O método de contagem consistiu em contabilizar todo o material presente em cada tubo, de cada ensaio. Contudo, é de referir que não foram contabilizados os 20 tubos de cada ensaio uma vez que convinha que as contagens fossem feitas no mesmo dia e, também, porque havia tubos contaminados. Deste modo foi necessário organizar o material, sendo feita uma amostragem que consistiu na análise de 5 tubos por ensaio (Tab.3)

**Tabela 3** – Esquema representativo da selecção de amostragem aleatória para efectuar contagens.

	o1	o2	o3	o4	o5	o6	o7	o8	o9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
MS+2,4D 9% Controlo																				
MS+4% ESCURO																				
MS+ABA4% ESCURO																				
MS+2% ESCURO																				
MS+4% LUZ																				
MS+ABA4% LUZ																				
MS+2% LUZ																				

Contagem
Reserva (estatística)
Excluídos Aleatoriamente
Contaminados

### 2.5.2.2. Conversão de ES cotiledonares e ES com desenvolvimento da parte caulinar em plântulas

Com base nos resultados obtidos no processo de germinação de embriões somáticos (ES) e possível conversão em plântulas, em feijoa, foi imprescindível testar a viabilidade de conversão de ES, apenas nas fases de desenvolvimento que poderão potenciar a

conversão para uma nova planta (ES cotiledonares, ES já com desenvolvimento do ápice caulinar).

Uma vez que, no ensaio anterior foi notória a reduzida sincronização das fases embrionárias levando, conseqüentemente, ao aumento de massa por tubo de ensaio, torna-se difícil a tarefa de testar a viabilidade exacta de conversão ES e posterior desenvolvimento da planta jovem.

Deste modo, procedeu-se ao ensaio descrito em seguida, que permitiu obter uma percentagem de conversão por número de embriões somáticos cotiledonares e por número de embriões somáticos com desenvolvimento apical caulinar, respectivamente..

Os explantes foram distribuídos por estágio de desenvolvimento e por ensaio de indução (inicial), respectivamente. Os explantes foram inoculados na câmara de fluxo, em Meio E (secção 2.5.2) e posteriormente expostos a um fotoperíodo de 16h de luz/10h de escuro à temperatura de  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , durante 8 semanas. Procedeu-se ao registo dos resultados quantitativos e qualitativos no final da experiência.

## **2.6. Efeito da dessecação na indução de embriogénese somática, em feijoa e tamarilho**

Este ensaio teve como principal objectivo analisar o efeito do stresse, neste caso, a dessecação, na indução de embriogénese somática em feijoa (via directa) e em tamarilho (via indirecta).

Como se trata de duas espécies distintas, em que a via de indução de embriogénese somática varia, bem como o tipo de explante inicialmente utilizado, o tempo em que os ensaios decorreram também variou. Em feijoa, a experiência decorreu durante 10 semanas, enquanto que no tamarilho o trabalho prático decorreu durante 15 semanas. Os ensaios foram analisados qualitativamente, em ambas as espécies, de 5 em 5 semanas.

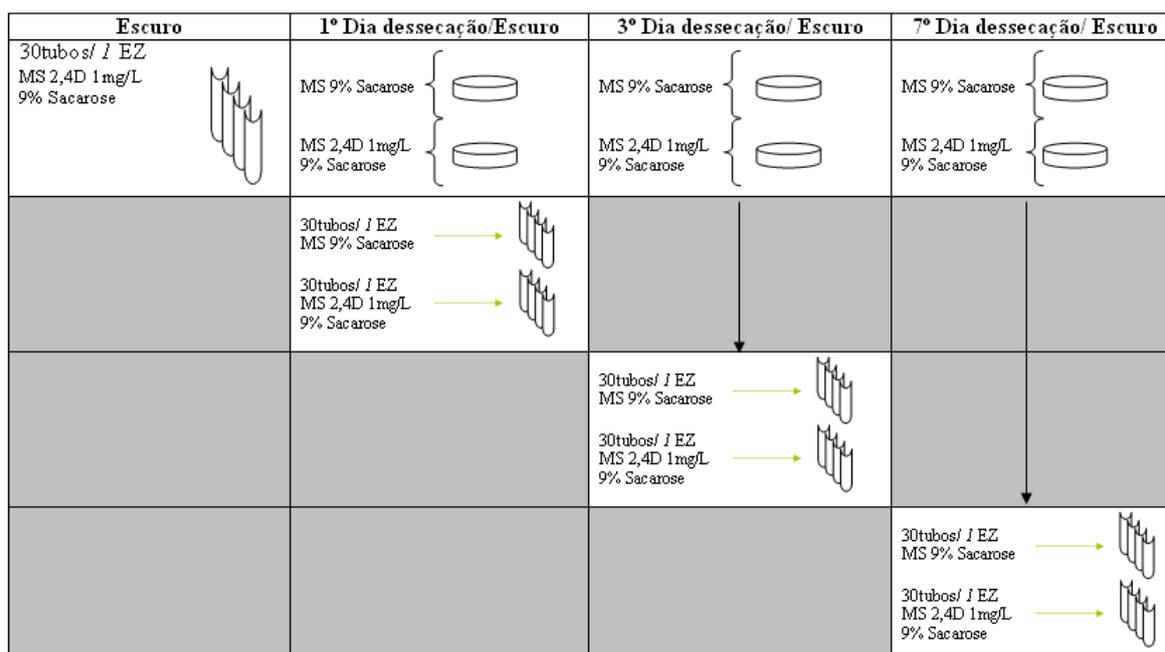
O meio de indução de embriogénese somática foi o mesmo para a feijoa e para o tamarilho, ou seja, meio base MS com suplemento de 1mg/L de 2-4,D e com ou sem 9% sacarose (secção 2.2).

### **2.6.1 Feijoa**

A preparação dos embriões zigóticos de feijoa para posterior inoculação em meio de cultura está descrita na secção 2.1.

Durante o primeiro dia de ensaio, foram isolados cerca de 210 embriões zigóticos (EZ) de feijoa, sendo que 30 dos quais foram imediatamente inoculados em tubos de ensaio em meio de indução MS 1mg/L de 2-4,D e 9% sacarose (controlo). Os restantes, cerca de 180 EZ, foram distribuídos por caixas de Petri estéreis (6 caixas de Petri), na câmara de fluxo (30 EZ/caixa de Petri) e, por sua vez estas foram lacradas devidamente para evitar contaminações por microrganismos, e mantidas no escuro, à temperatura ambiente.

Deste modo, os explantes foram sujeitos à dessecação durante 1 dia, 3 dias e 7 dias. Em cada dia (1,3 e 7), os embriões zigóticos eram colocados no respectivo meio de cultura, ou seja, 30 explantes/30 tubos com meio MS e 9% sacarose e 30 explantes/30 tubos com meio MS 1mg/L 2,4D e 9% sacarose (Fig.9).



**Figura 9** – Esquema representativo do ensaio experimental (secção 2.6.1.)

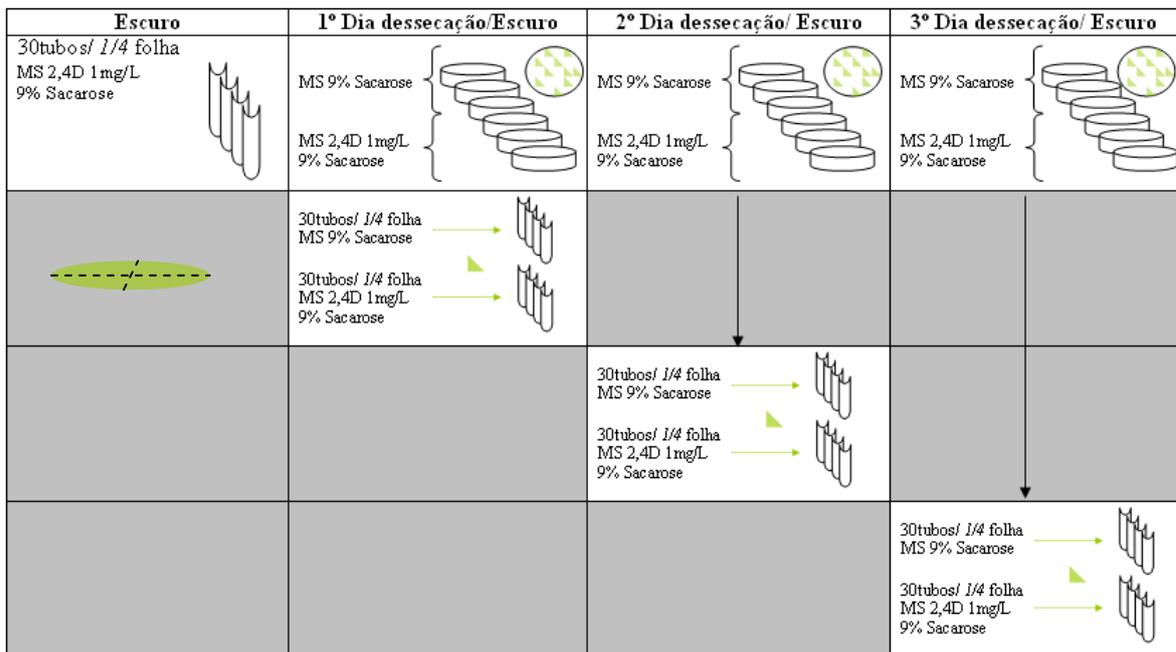
Este ensaio decorreu durante 10 semanas, estando o material numa estufa escura, à temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

## 2.6.2 Tamarilho

A preparação dos explantes de tamarilho para posterior inoculação em meio de cultura foi feita a partir de plântulas jovens, estando estas em condições estéreis, *in vitro*. Os cortes foram executados primeiro ao longo da nervura, isto é, paralelamente sem a incluir, e depois perpendicularmente à mesma (Fig.12).

Durante o primeiro dia de ensaio, foram preparados cerca de 210 explantes (1/4 de folha), sendo que 30 dos quais foram imediatamente inoculados em tubos de ensaio em meio de indução MS 1mg/L de 2-4,D e 9% sacarose (controlo). Os restantes, cerca de 180, foram distribuídos por caixas de Petri estéreis (6 caixas de Petri), na câmara de fluxo (30 partes de folha/caixa de Petri) e, por sua vez estas foram lacradas devidamente para evitar contaminações, e mantidas no escuro, à temperatura ambiente.

Deste modo, os explantes foram sujeitos à dessecação durante 1 dia, 2 e 3 dias. Em cada dia (1,2 e 3), os explantes foram colocados no respectivo meio de cultura, ou seja, 30 explantes/30 tubos com meio MS e 9% sacarose e 30 explantes/30 tubos com meio MS 1mg/L 2,4D e 9% sacarose (Fig.10).



**Figura 10** - Esquema representativo do ensaio experimental (secção 2.6.2.)

Este ensaio decorreu durante 15 semanas, estando o material numa estufa escura, à temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

## 2.7. Efeito da concentração da auxina 2,4-D no meio de cultura na indução de embriogénese somática em feijoa

Este ensaio tem como principal objectivo testar o efeito de diferentes concentrações de 2,4-D, ao longo de 8 semanas, no escuro e a  $25\pm 1^\circ\text{C}$ , na indução de embriogénese somática a partir de embriões zigóticos de feijoa (via directa).

A preparação dos explantes de feijoa para posterior inoculação em meio de cultura está descrita na secção 2.1.

O meio de indução utilizado neste ensaio foi o meio MS com 1 ou 0,5 mg/l de 2,4-D e 9% sacarose. Os explantes foram mantidos neste meio ao longo do ensaio ou transferidos para meios com concentrações mais baixas de 2,4-D conforme indicado na tabela 4.

Foram preparados inicialmente 10 tubos por tratamento (Tab.4 – Tratamento 1-8), com o respectivo meio de cultura. Cada tubo continha apenas um embrião zigótico, ou seja, no primeiro dia de trabalho foi necessário isolar e inocular aproximadamente 80 embriões zigóticos de feijoa. O ensaio decorreu durante um total de oito semanas.

**Tabela 4** - Esquema representativo do ensaio experimental (secção 2.7.)

Tratamento	Semana 0	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	
1	MS 2,4-D 1mg/L 9% <i>sac</i>	→				
2	MS 2,4-D 1mg/L 9% <i>sac</i>	→		MS 2,4-D 0.5 mg/L 9% <i>sac</i>	→	
3	MS 2,4-D 1mg/L 9% <i>sac</i>	MS 2,4-D 0.5 mg/L 9% <i>sac</i>	→			
4	MS 2,4-D 1mg/L 9% <i>sac</i>	MS 2,4-D 0.5 mg/L 9% <i>sac</i>	MS 2,4-D 0.25 mg/L 9% <i>sac</i>	→		Fim
5	MS 2,4-D 1mg/L 9% <i>sac</i>	MS 2,4-D 0.5 mg/L 9% <i>sac</i>	MS 2,4-D 0.25 mg/L 9% <i>sac</i>	MS 2,4-D 0.1mg/L 9% <i>sac</i>		
6	MS 2,4-D 0.5 mg/L 9% <i>sac</i>	→		MS 2,4-D 0.25 mg/L 9% <i>sac</i>	→	
7	MS 2,4-D 0.5 mg/L 9% <i>sac</i>	MS 2,4-D 0.25 mg/L 9% <i>sac</i>	→			
8	MS 2,4-D 0.5 mg/L 9% <i>sac</i>	→				

## 2.8. Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos foi feita no programa SPSS. Foram efectuados testes de Tuckey (teste T), testes de Levene, testes de Dunnet, bem como ANOVAs para testar a variância entre dados e verificar se as diferenças entre amostras eram, ou não, significativas ( $p=0,05$ ).

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Estudos quantitativos e histoquímicos de substâncias de reserva em embriões zigóticos e somáticos de feijoa e de tamarilho**

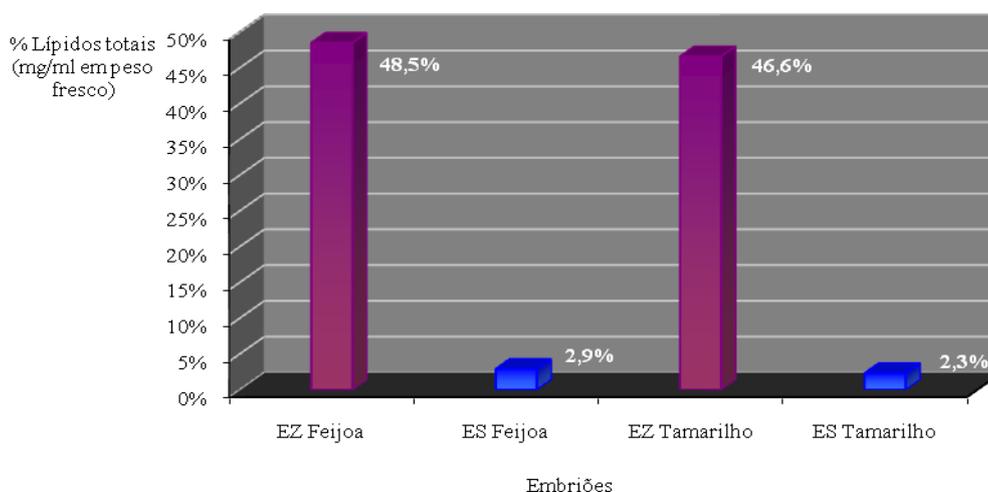
Os estudos quantitativos e histoquímicos de substâncias de reserva foram efectuados em quatro amostras distintas: embriões zigóticos de feijoa (EZ feijoa); embriões somáticos de feijoa (ES feijoa); embriões zigóticos de tamarilho (EZ tamarilho); e embriões somáticos de tamarilho (ES tamarilho). Em cada tipo de amostra procedeu-se individualmente à extracção e quantificação três vezes, de modo a sustentar os resultados (n=3).

### 3.1.1. Lípidos totais

#### 3.1.1.1. Análise quantitativa

Através da análise espectrofotométrica foi possível quantificar os lípidos totais das amostras acima referidas, as quais demonstraram uma diferença acentuada entre embriões zigóticos e embriões somáticos, de ambas as espécies lenhosas. Na feijoa, os embriões zigóticos apresentam uma percentagem total de lípidos de 48,5% ao invés dos embriões somáticos que apenas demonstram conter 2,9%. No tamarilho obtiveram-se resultados semelhantes com 46,6% e 2,3%, respectivamente (Fig.11). Deste, modo verifica-se que entre as duas espécies, e para os dois tipos de embriões, o teor de lípidos totais é muito semelhante.

Tanto na feijoa como no tamarilho os embriões zigóticos apresentam conteúdo lipídico superior ao mesmo conteúdo em embriões somáticos, de acordo com o esperado.



**Figura 11** – Percentagem de lípidos totais (peso fresco) em embriões zigóticos (EZ) e somáticos (ES) de feijoa e tamarilho.

As diferenças quantitativas de lípidos entre os dois tipos de embriões, zigóticos e somáticos de ambas as espécies, são significativas. Segundo a análise estatística, comparando embriões zigóticos com embriões somáticos da mesma espécie há homogeneidade de variâncias (teste Levene) e mediante o teste T para amostras independentes (valor de  $p=0.000$ ,  $\alpha=0.05$ ), é possível verificar que as médias de lípidos de cada amostra são diferentes.

### 3.1.1.2. Análise histoquímica

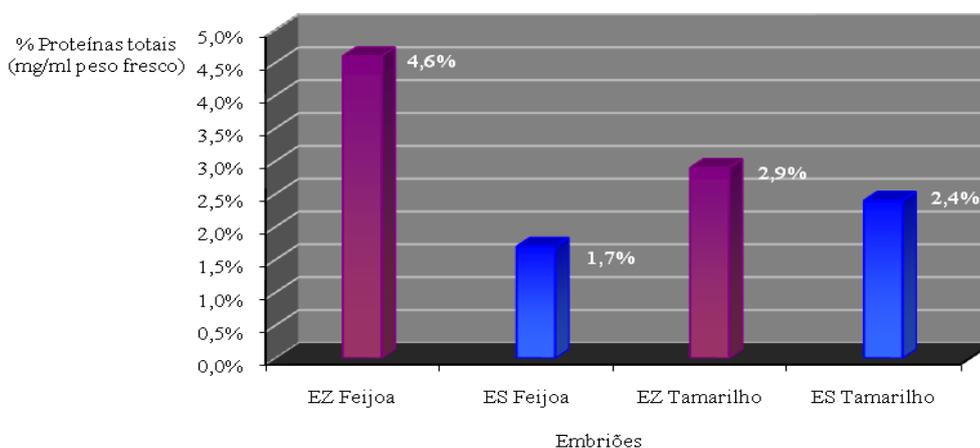
De certo modo, o estudo histoquímico de todas as amostras veio demonstrar os resultados obtidos de quantificação. Os lípidos encontram-se armazenados em corpos lipídicos. É possível observar que em embriões zigóticos de ambas as espécies (EST.I A e C) a coloração de lípidos é mais acentuada (cor castanha) do que em embriões somáticos (EST.I B e D).

Outra característica importante a salientar é a maior vacuolização nas células dos embriões somáticos relativamente às células dos embriões zigóticos, das duas espécies estudadas.

### 3.1.2. Proteínas totais

#### 3.1.2.1. Análise quantitativa

A partir de ensaios de espectrofotometria foi possível quantificar as proteínas totais das amostras, as quais demonstraram, tal como no caso dos lípidos, diferenças entre embriões zigóticos e embriões somáticos, de ambas as espécies. Na feijoa, os embriões zigóticos apresentam uma percentagem total de proteínas de 4,6% ao contrário dos embriões somáticos que apenas contêm 1,7% (Fig.12). No tamarilho a diferença entre os dois tipos de embriões é menor, tendo os embriões zigóticos 2,9% de proteínas totais e os embriões somáticos 2,4% das mesmas (Fig.12). Os dados mostram que existem variações acentuadas entre embriões somáticos e zigóticos. Porém, as diferenças de conteúdos não são tão acentuadas como as que se observaram no método de quantificação lipídica.



**Figura 12** – Percentagem de proteínas totais (peso fresco) de embriões zigóticos (EZ) e somáticos (ES) de feijoa e tamarilho.

As diferenças quantitativas de proteínas entre os dois tipos de embriões, zigóticos e somáticos de ambas as espécies, não são estatisticamente significativas. Segundo a análise estatística, comparando embriões zigóticos com embriões somáticos da mesma espécie há homogeneidade de variâncias (teste Levene) e mediante o teste T para amostras independentes (valor de  $p=0.479$  para feijoa e de  $p=0.605$  para tamarilho,  $\alpha=0.05$ ), é possível depreender que as médias de proteínas totais de cada amostra são análogas.

#### 3.1.2.2. Análise histoquímica

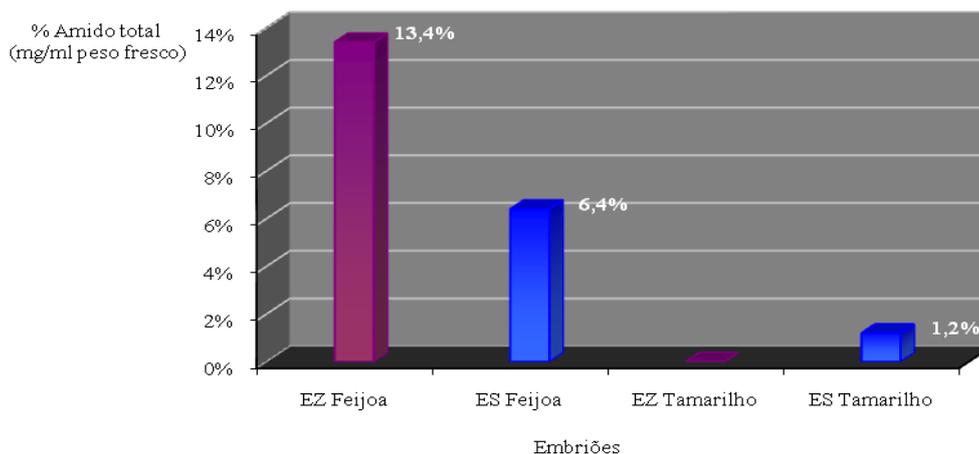
O estudo histoquímico de todas as amostras veio em parte comprovar os resultados obtidos na quantificação. As proteínas encontram-se acumuladas em corpos proteicos. É possível observar que em embriões zigóticos de ambas as espécies (EST.II A e C) a coloração de corpos proteicos é mais acentuada e numerosa (cor azul) do que em embriões somáticos, nos quais se observa uma acumulação de proteínas mais à periferia celular em consequência de uma maior vacuolização celular. Para além disso, os corpos proteicos são mais pequenos e menos numerosos nos embriões somáticos de ambas as espécies (EST.II B e D).

#### 3.1.3. Amido total

##### 3.1.3.1. Análise quantitativa

A partir de ensaios de espectrofotometria foi possível quantificar o amido das amostras inicialmente referidas, as quais mostraram diferença entre embriões zigóticos e embriões somáticos, de ambas as espécies. Na feijoa, os embriões zigóticos apresentam uma percentagem total de amido de 13,4% ao contrário dos embriões somáticos que apenas demonstram ter 6,4% (Fig.13). No tamarilho a diferença entre os dois tipos de embriões é menor e inversa ao descrito em todos os casos até agora. Os embriões zigóticos não demonstram conter amido e os embriões somáticos contêm 1,2% de amido total (Fig.13).

Na feijoa os embriões zigóticos apresentam uma percentagem de amido superior à observada em embriões somáticos. No tamarilho ocorreu a situação inversa, isto é, os embriões somáticos apresentam uma percentagem de amido superior à verificada nos embriões zigóticos.



**Figura 13** – Percentagem de amido total (peso fresco) de embriões zigóticos (EZ) e somáticos (ES) de feijoa e tamarilho.

As diferenças quantitativas de amido entre embriões zigóticos e somáticos de feijoa são significativas, o mesmo não se tendo verificado no tamarilho. De acordo com a análise estatística, comparando embriões zigóticos com embriões somáticos da mesma espécie há homogeneidade de variâncias (teste Levene) e mediante o teste-T para amostras independentes (valor de  $p=0.007$  para feijoa e de  $p=0.95$  para tamarilho,  $\alpha=0.05$ ), é possível depreender que, as médias de amido total de cada amostra são estatisticamente diferentes em feijoa e iguais em tamarilho.

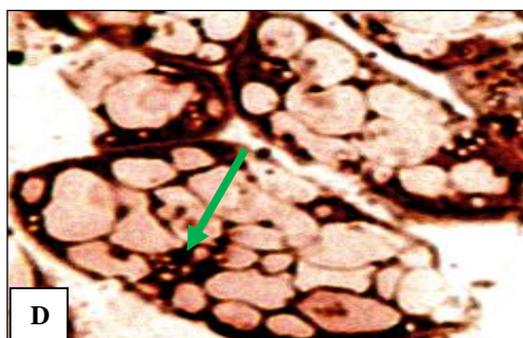
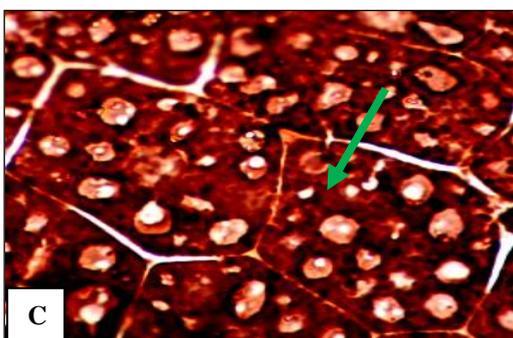
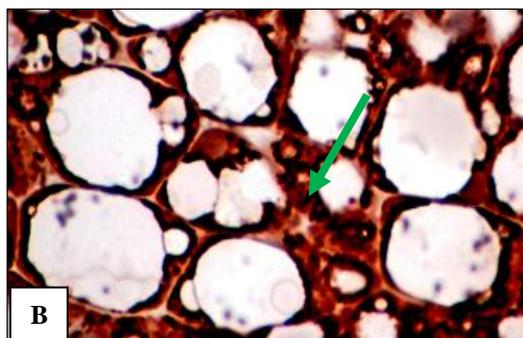
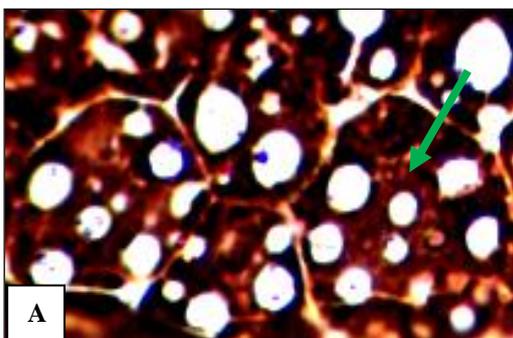
### 3.1.3.2. Análise histoquímica

Apesar da coloração histoquímica também corar proteínas (rosa-claro), a coloração de amido também é perceptível (rosa ou roxo-escuro). A análise histoquímica de todas as amostras não veio demonstrar, aparentemente, os resultados obtidos na quantificação.

O amido encontra-se armazenado sob a forma de grânulos em amiloplastos. É possível observar que em embriões zigóticos de ambas as espécies (EST.III A e C) a coloração de amido é mais escassa do que em embriões somáticos, nos quais se observa uma acumulação de amido, também restrita à periferia celular mas em maior número (EST.III B e D).

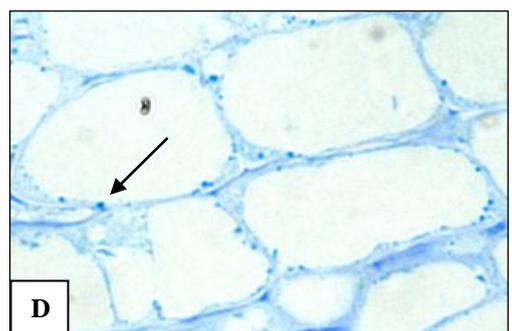
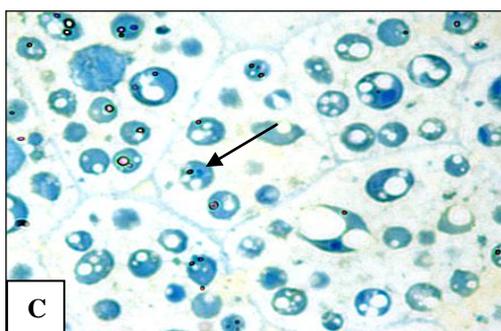
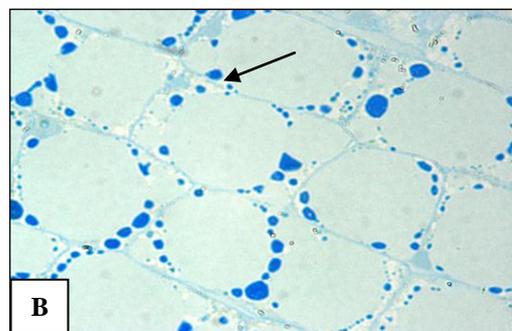
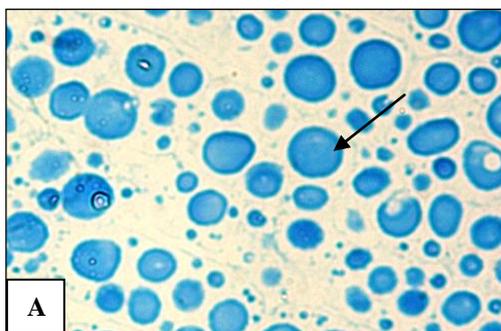
## ESTAMPA I

Análise histoquímica dos lípidos totais em células dos cotilédones por coloração com o negro do Sudão B. **A** - Lípidos em embrião zigótico de feijoa (100x); **B** - Lípidos em embrião somático de feijoa (100x); **C** - Lípidos em embrião zigótico de tamarilho (100x); **D** - Lípidos em embrião somático de tamarilho (100x). As setas de todas as ilustrações indicam corpos lipídicos.



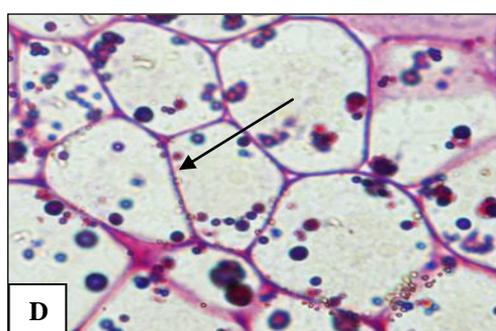
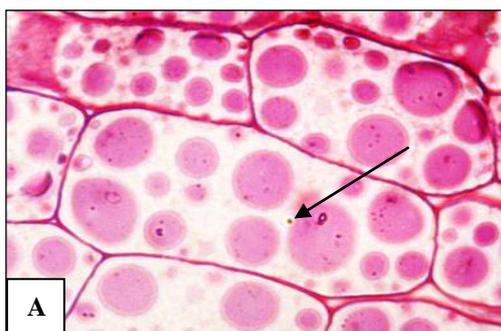
## ESTAMPA II

Análise histoquímica das proteínas totais em células dos cotilédones por coloração com azul de mercúrio de bromofenol. **A** - Proteínas em embrião zigótico de feijoa (100x); **B** - Proteínas em embrião somático de feijoa (100x); **C** - Proteínas em embrião zigótico de tamarilho (100x); **D** - Proteínas em embrião somático de tamarilho (100x). As setas de todas as ilustrações indicam corpos proteicos.



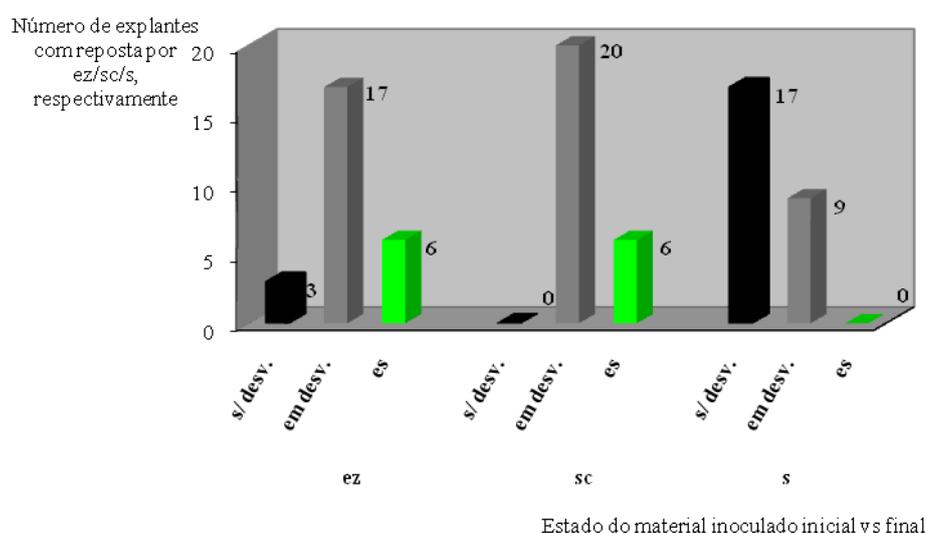
**ESTAMPA III**

Análise histoquímica de amido total em células dos cotilédones por coloração com ácido periódico/reagente de Schiff. **A** - Amido em embrião zigótico de feijoa (100x); **B** - Amido em embrião somático de feijoa (100x); **C** - Amido em embrião zigótico de tamarilho (100x); **D** - Amido em embrião somático de tamarilho (100x). As setas de todas as ilustrações indicam grãos de amido.



### 3.2. Estudo do efeito do estado do material inoculado na indução de embriogénese somática em feijoa

O objectivo principal deste ensaio foi analisar a indução de embriogénese somática, em feijoa, fazendo variar o estado do material inoculado. Deste modo, foram inoculados em meio de indução MS com 1mg/L 2,4-D e 9% sacarose, 26 embriões zigóticos (ez), 26 sementes com cortes apenas ao nível do tegumento (sc) e 26 sementes intactas (s), durante 8 semanas.



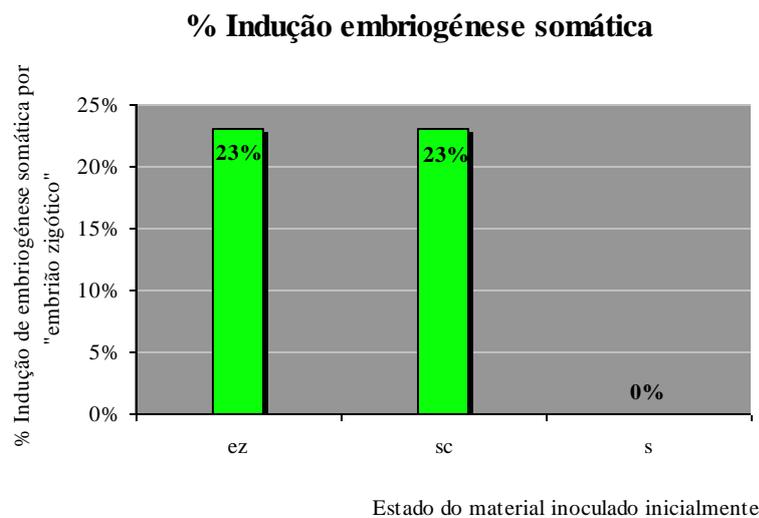
**Figura 14** – Indução de embriogénese somática em diferentes explantes: embriões zigóticos (ez); sementes cortadas (sc); e sementes intactas (s).

Ao fim de 8 semanas foram registados os resultados quer quantitativa quer qualitativamente. Dos 26 embriões zigóticos inoculados 3 mostraram não ter qualquer desenvolvimento (s/ desv.) desde o momento inicial da experiência. Dos restantes, 17 encontravam-se em fase inicial de desenvolvimento embrionário (em desv.), ou seja, ainda sem formação evidente de embriões, não se encontrando, por isso, nas fases de desenvolvimento embrionário mais avançadas como torpedo, cordiforme e cotiledonar. Os outros, 6 embriões zigóticos, originaram inúmeros embriões somáticos já bem diferenciados (Fig.14, EST.IV A).

Os resultados obtidos a partir de sementes cortadas apenas na região do tegumento são muito semelhantes aos resultados anteriormente referidos. Contudo, observou-se que nenhum dos explantes se manteve no estado inicial, isto é, sem qualquer alteração,

verificando-se 20 em desenvolvimento embrionário e 6 com embriões bem definidos já numa fase avançada de desenvolvimento embrionário (Fig.14, EST.IV B).

Os resultados verificados partindo da inoculação de sementes intactas foram significativamente diferentes dos resultados anteriores (EST.IV C e D). Em nenhum explante inoculado ocorreu formação de embriões somáticos bem diferenciados e apenas 9 dos 26 explantes mostraram diferenciação embrionária. Das sementes intactas inoculadas a maioria (17), manteve-se no estado original (Fig.14).

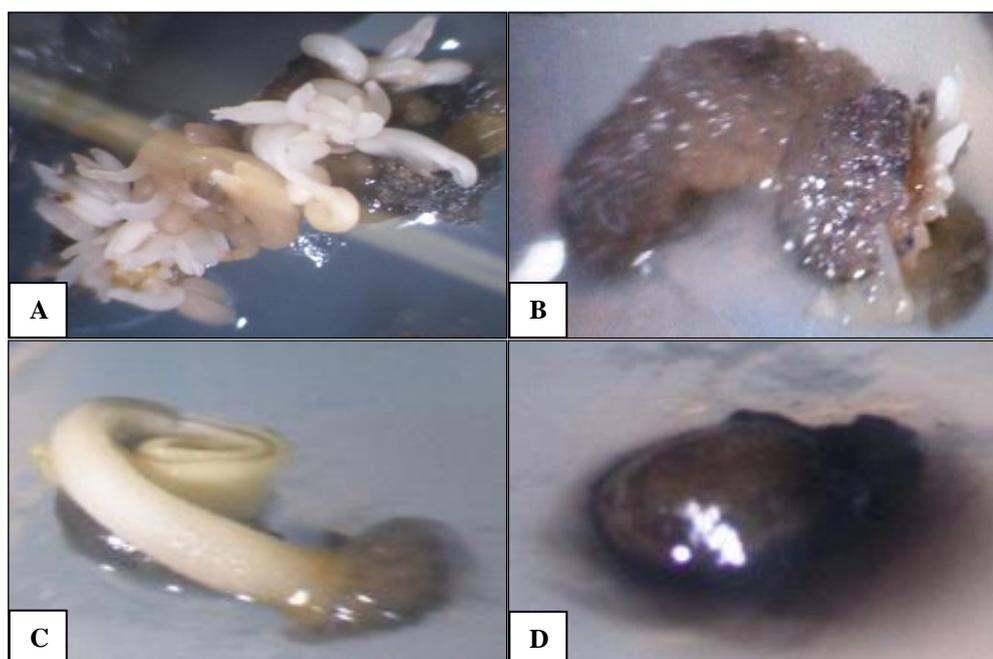


**Figura 15** – Percentagem de indução de embriogénese somática por embrião zigótico (ez), semente cortada (sc) e semente intacta (s).

Convertidos os valores obtidos em percentagens é de notar que, tanto os embriões zigóticos como as sementes cortadas deram origem a percentagens de indução idênticas (23%), enquanto nas sementes intactas a percentagem de indução de embriogénese somática foi nula (Fig.15).

## ESTAMPA IV

Estado de desenvolvimento dos explantes inoculados. **A** - Embriões somáticos com origem em embrião zigótico isolado (1.8x); **B** - Embriões somáticos com origem em embrião zigótico contido em semente cortada (1.7x); **C** - Semente intacta com embrião zigótico a alongar (1.4x); **D** - Semente intacta sem qualquer desenvolvimento (1x).

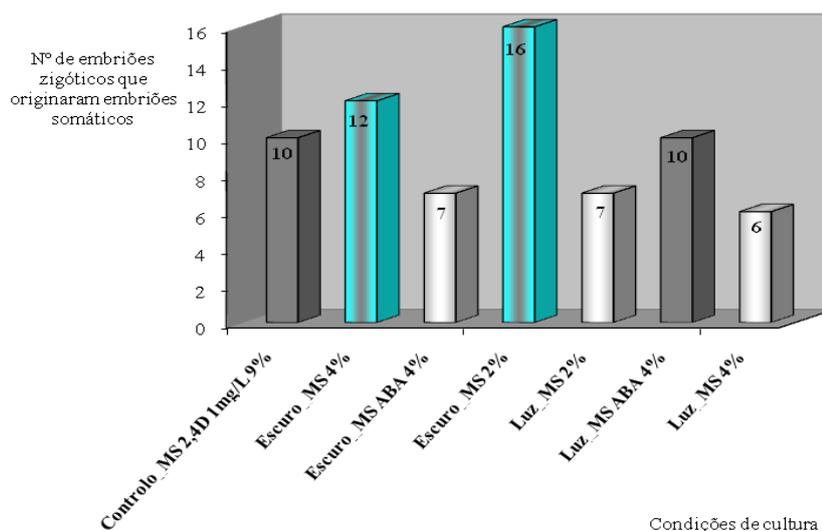


### 3.3. Estudo do efeito das condições e de meios de cultura na indução e conversão de embriões somáticos de feijoa

#### 3.3.1. Indução de embriões somáticos

O objectivo primordial deste ensaio foi testar a capacidade de induzir embriogénese somática, em diferentes meios e condições de cultura, tendo sido analisado o efeito da luz, sacarose e ABA.

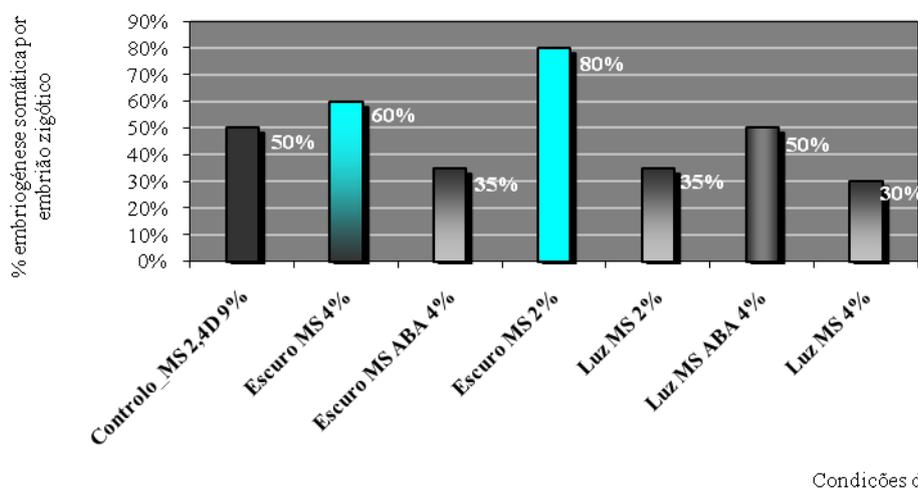
O ensaio decorreu em duas etapas consecutivas, 4 semanas cada, isto é, o tempo total da experiência foi de 8 semanas. Os embriões zigóticos foram inoculados inicialmente em meio de indução MS com 1mg/L 2,4-D e 9% sacarose, durante 4 semanas. Após este período transferiram-se os explantes para três tipos de meio de indução distintos e duas condições de cultura também diferentes. Apenas o ensaio de controlo foi mantido em cultura contínua. Os resultados obtidos estão representados na figura 16.



**Figura 16** – Efeito do meio e condições de cultura na indução de embriogénese somática.

Partindo de amostras com igual número de explantes (n=20), ao fim de 8 semanas de cultura, foi possível observar resultados distintos entre os vários tratamentos aplicados.

A cultura contínua de embriões zigóticos em meio MS com suplemento de 1mg/L de 2,4-D e 9% sacarose, no escuro, funcionou como controlo na experiência uma vez que é por esta via que a indução de embriogénese somática em feijoa é conseguida. Os resultados revelaram que apenas em metade dos explantes (50%) submetidos a estas condições de indução, se conseguiu obter embriões somáticos bem diferenciados (Fig.17, EST.V A).

**% Indução de embriogênese somática**

**Figura 17** – Efeito do meio e condições de cultura na indução de embriogênese somática de acordo com as condições cultura, em percentagem (%).

Na indução de embriogênese somática no escuro e em meio MS sem suplemento de 2 mg/L de ABA, com concentrações mais baixas de sacarose (2 e 4%) foi possível observar uma maior percentagem de embriões zigóticos que conseguiram originar embriões somáticos, 60% e 80%, respectivamente (EST.V B e D). Na presença de ABA e mesmo com menor concentração de sacarose, em comparação com o meio de controlo, a indução de embriogênese somática foi apenas conseguida em 35% dos explantes (Fig.17), (EST.V C).

A luz parece condicionar a indução de embriogênese somática nesta espécie. Nos três casos testados apenas os explantes submetidos a meio MS com suplemento de 2 mg/L ABA e 4% sacarose deram resultados semelhantes ao teste controlo, ou seja, apenas 50% de embriões zigóticos que conseguiram originar embriões somáticos. Nas amostragens efectuadas em meio MS sem ABA e apenas com 2% e 4% de sacarose, só 35% e 30% embriões zigóticos, respectivamente, conseguiram ser induzidos para a formação de embriões somáticos (Fig.17, EST.V E, F e G).

Para aprofundar a análise dos dados foi efectuada a análise estatística dos mesmos. A ANOVA uma via realizada, indicou que há diferenças entre as médias da amostragem ( $p=0.02$ ,  $\alpha=0,05$ ). Contudo é importante perceber se as diferenças são significativas em

relação ao controlo. Para isso foi realizado o teste de comparações múltiplas de Dunnett, a partir do qual foi possível perceber que estatisticamente não há diferenças significativas entre os tratamentos e o tratamento controlo (todos valores  $P > \alpha = 0,05$ ).

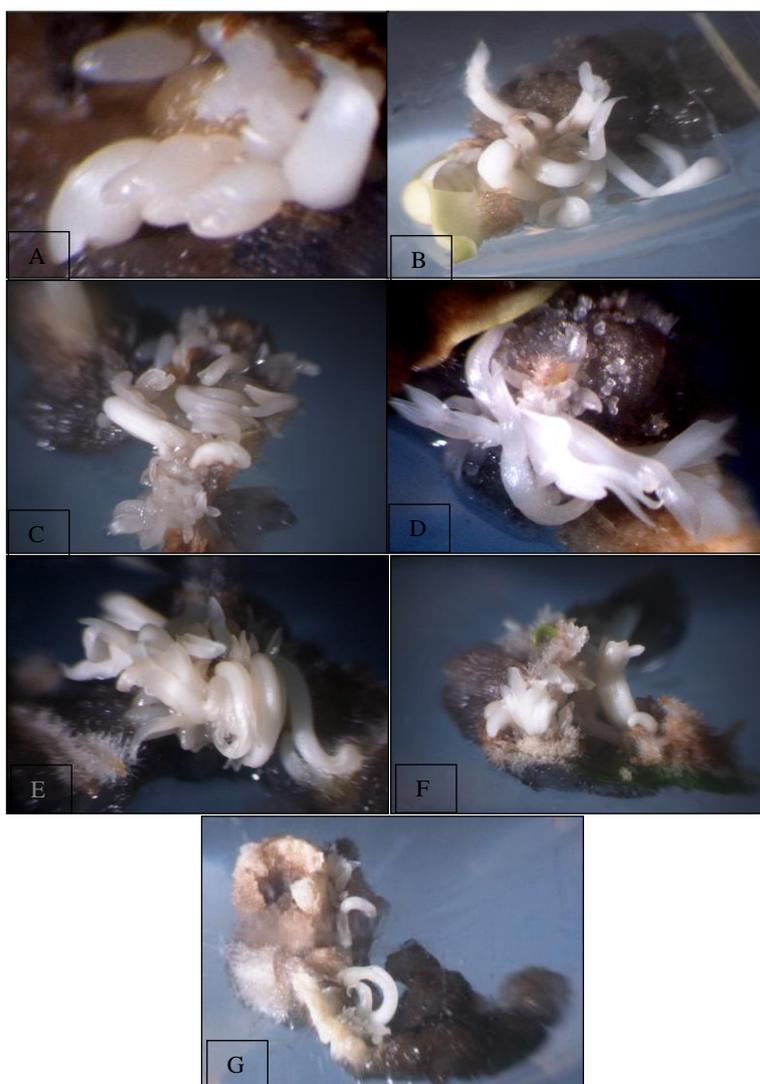
Contudo, é possível inferir que o tratamento, que induziu maior taxa de embriogénese somática, em feijoa foi aquele em que se procedeu à passagem dos explantes para meio MS com 2% sacarose, no escuro, com valor de 80% de indução de embriogénese somática.

É de salientar que mediante os resultados obtidos nesta experiência, houve a repetição do ensaio acima referido, em que os embriões que daí advieram foram sujeitos à análise de quantificação de substâncias de reserva, nomeadamente os lípidos, de acordo com o descrito na secção 2.3.1.2., capítulo 2.

Os resultados de quantificação de lípidos totais em embriões somáticos obtidos em cultura descontínua, ou seja, embriões zigóticos inoculados em meio MS com suplemento de 1mg/ml 2,4-D e 9% de sacarose, no escuro, durante 4 semanas e posteriormente com a passagem dos explantes para meio MS com 2% sacarose, também no escuro, não foram significativamente distintos dos embriões somáticos induzidos continuamente em meio MS com suplemento de 1mg/ml 2,4-D e 9% de sacarose (controlo deste ensaio), durante 10 semanas de acordo com o ensaio descrito na secção 3.1.1. Os embriões somáticos de cultura descontínua revelaram ter 8% de conteúdo lipídico total e os embriões somáticos de cultura contínua 2,9%. Apesar da diferença entre embriões somáticos, quando comparados com o valor de conteúdo lipídico dos embriões zigóticos da mesma espécie, 48,5%, continua a haver diferenças significativas entre embriões zigóticos e somáticos.

## ESTAMPA V

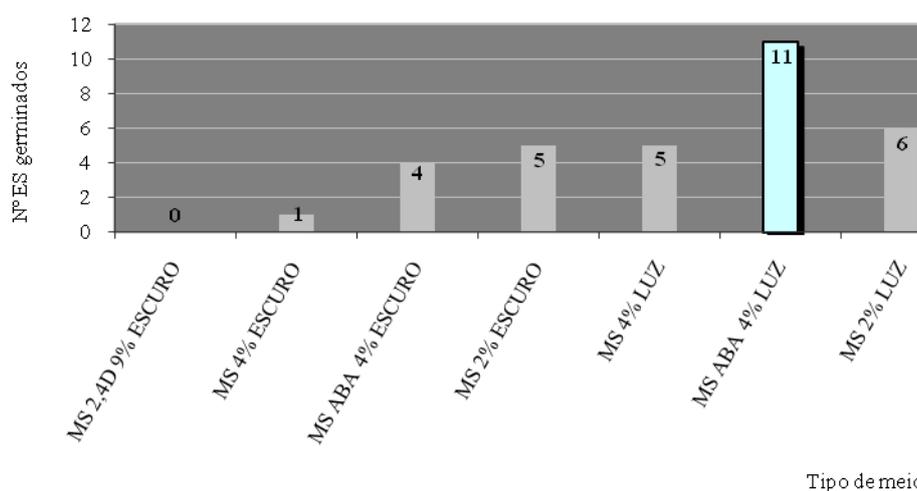
Efeito das condições e de meios de cultura na indução de embriões somáticos ao fim de 8 semanas de tratamento, em feijoa. **A** – Embriões somáticos induzidos em meio MS 1mg/L 2,4-D e 9% sacarose, no escuro (5x); **B** – Embriões somáticos induzidos em meio MS 4% sacarose, no escuro (1.4x); **C** – Embriões somáticos induzidos em meio MS 2mg/L ABA e 4% sacarose, no escuro (2.6x); **D** – Embriões somáticos induzidos em meio MS 2% sacarose, no escuro (2.4x); **E** – Embriões somáticos induzidos em meio MS 4% sacarose, sob fotoperíodo (3.2x); **F** – Embriões somáticos induzidos em meio MS 2mg/L ABA e 4% sacarose, sob fotoperíodo (2.4x); **G** – Embriões somáticos induzidos em meio MS 2% sacarose, sob fotoperíodo (2.4x).



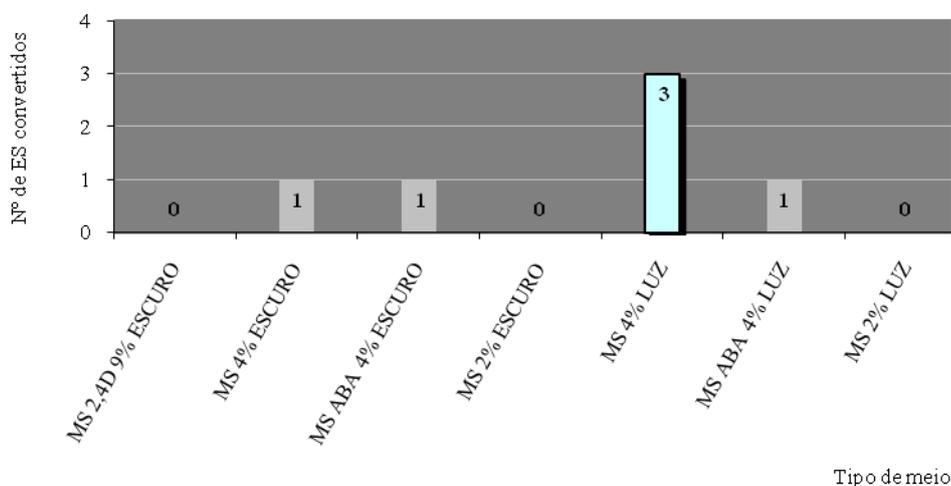
### 3.3.2. Germinação de embriões somáticos e conversão em plântulas

Com base nos resultados obtidos no processo de indução de embriogénese somática em feijoa (secção 3.3.1), foi importante testar a germinação e conversão dos embriões somáticos em plantas. Uma vez que em muitos casos a germinação não ocorreu de forma normal, foram contabilizados os embriões em que se presenciou o desenvolvimento da parte caulinar ou da parte radicular (Fig.18).

Após as 10 semanas dos explantes em cultura, os resultados de cada ensaio foram fotografados e foram efectuadas contagens do material em estudo. Os resultados das contagens encontram-se resumidos nas figuras: 18 - número de embriões somáticos germinados; 19 – número de plantas convertidas; 20 – número de embriões germinados anómalos; 21 – número de embriões somáticos normais, em fase cotiledonar; e, 22 - número de embriões somáticos anómalos maduros.



**Figura 18** – Número de embriões somáticos germinados em função dos diferentes tratamentos



**Figura 19** – Número de plantas obtidas nos diferentes tratamentos.

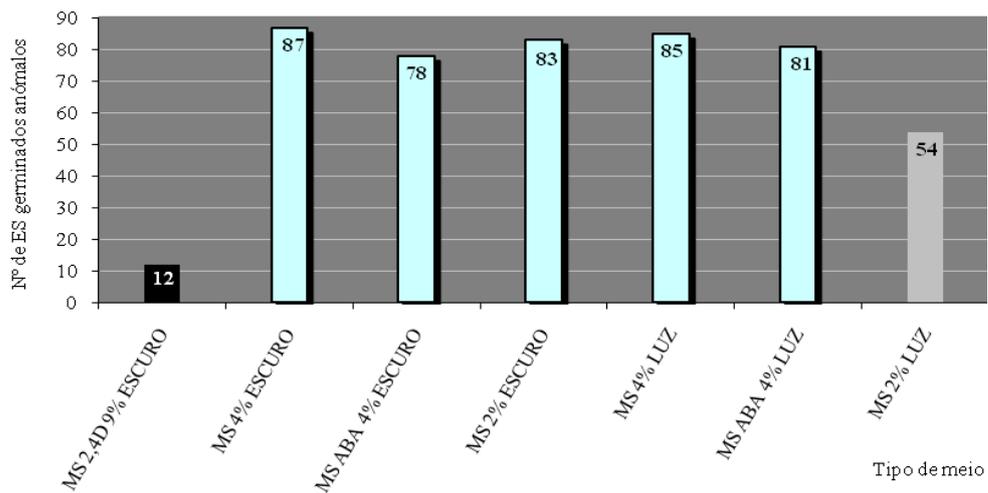


Figura 20 – Número de embriões somáticos germinados anómalos.

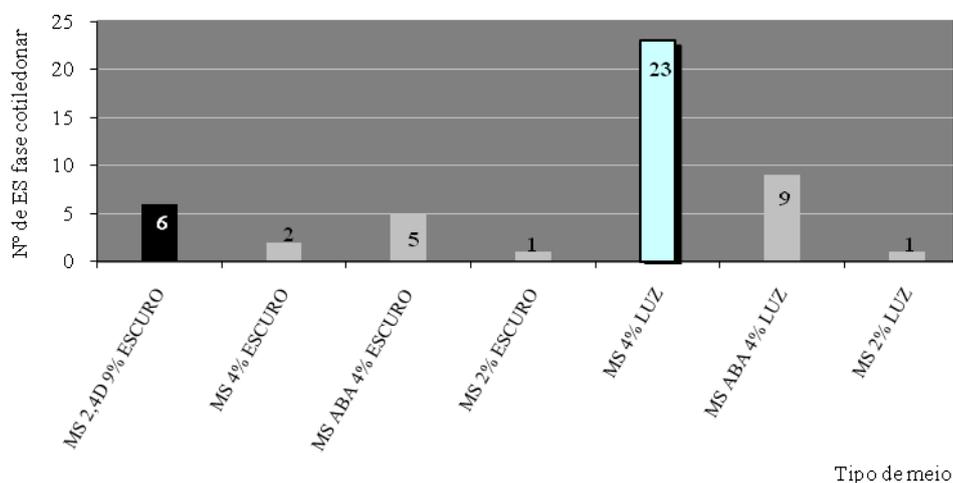


Figura 21 – Número de embriões somáticos normais, em fase cotiledonar.

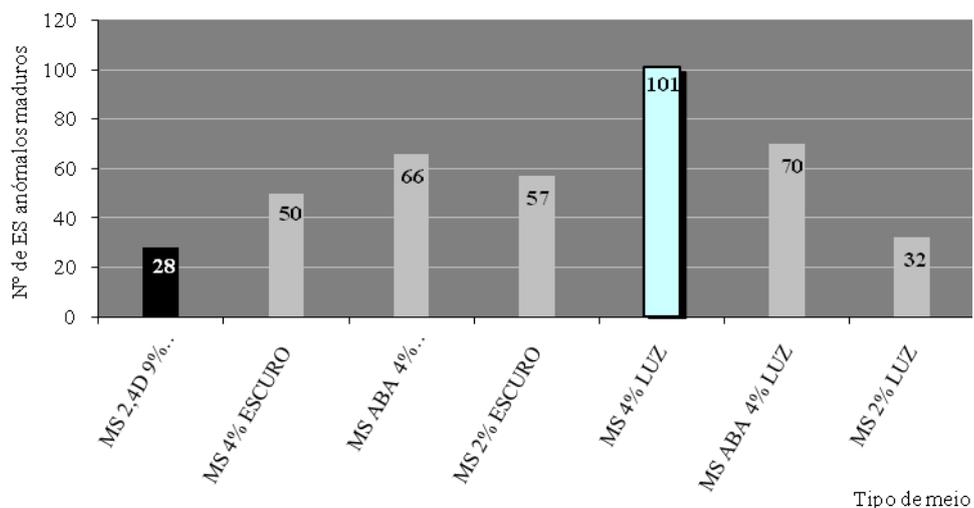


Figura 22 – Número de embriões somáticos anómalos maduros.

**Tabela 3** – Percentagem de embriões somáticos em diferentes estados de desenvolvimento de acordo com o respectivo tipo de meio (ES – embriões somáticos; M.G. – meio de germinação; Fp. – fotoperíodo).

Indução:	MS 2,4D 9% <b>ESCURO</b> Controlo	MS+4% <b>ESCURO</b>	MS+ABA4% <b>ESCURO</b>	MS+2% <b>ESCURO</b>	MS+4% LUZ	MS+ABA4% LUZ	MS+2% LUZ
Germinação:	M.G. Fp.	M.G. Fp.	M.G. Fp.	M.G. Fp.	M.G. Fp.	M.G. Fp.	M.G. Fp.
% ES germinados	0	1	3	3	2	6	6
% ES convertidos	0	1	1	0	1	1	0
% ES germinados anómalos	26	62	51	57	39	47	58
% ES cotiledonar	13	1	3	1	11	5	1
% ES anómalos maduros	61	35	42	39	47	41	35

Convertendo os resultados das contagens para percentagem é possível verificar que, em todos os tratamento efectuados, a maior percentagem de embriões presentes consiste em embriões somáticos germinados anómalos ou anómalos maduros (Tab.3).

Contudo, foi no ensaio controlo que se obteve maior percentagem de embriões somáticos normais na fase cotiledonar (13%). Nos ensaios de indução com, e sem, ABA e 2% de sacarose, na luz foi onde se verificou maior percentagem de embriões somáticos germinados, 6% (Tab.3).

Em todos os tratamentos foi possível verificar uma contínua indução de embriogénese somática, mesmo em meio de maturação e germinação, e por isso também uma dessincronização dos estados de desenvolvimento embrionário (EST.VI), bem como o aparecimento de pigmentação vermelha nos embriões somáticos, que corresponde à acumulação de antocianinas vacuolares devido à exposição à luz (EST.VI D,E e F).

## ESTAMPA VI

Desenvolvimento dos embriões em diferentes meios de cultura. **A** – Desenvolvimento dos embriões somáticos induzidos inicialmente em meio MS 1mg/L 2,4-D e 9% sacarose, no escuro; **B** – Desenvolvimento dos embriões somáticos induzidos inicialmente em meio MS 4% sacarose, no escuro; **C** – Desenvolvimento dos embriões somáticos induzidos inicialmente em meio MS 2mg/L ABA e 4% sacarose, no escuro; **D** – Desenvolvimento dos embriões somáticos induzidos inicialmente em meio MS 2% sacarose, no escuro; **E** – Desenvolvimento dos embriões somáticos induzidos inicialmente em meio MS 4% sacarose, em fotoperíodo; **F** – Desenvolvimento dos embriões somáticos induzidos inicialmente em meio MS 2mg/L ABA e 4% sacarose, em fotoperíodo; **G** – Desenvolvimento dos embriões somáticos induzidos inicialmente em meio MS 2% sacarose, em fotoperíodo.

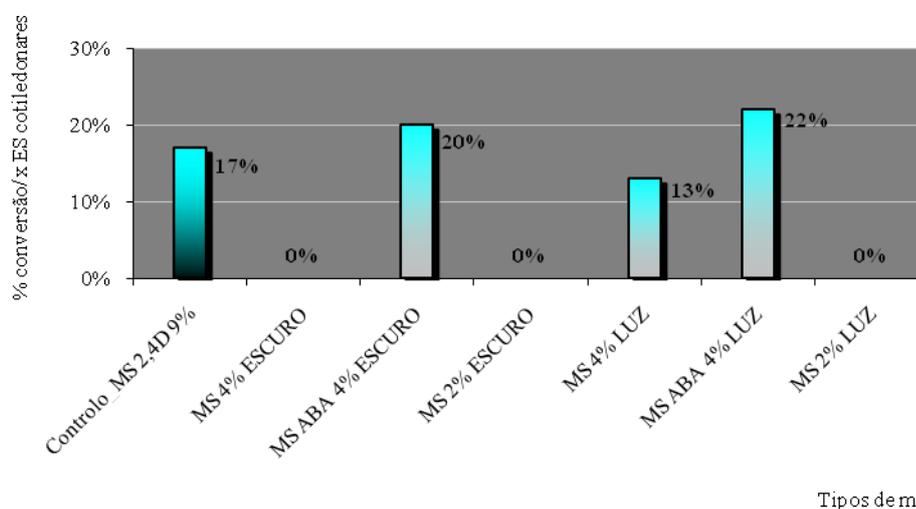


### 3.3.3. Conversão de embriões somáticos cotiledonares e embriões somáticos normais germinados no ápice, em plântulas

Com base nos resultados obtidos no processo de germinação de embriões somáticos e possível conversão em plântulas, em feijoa, testou-se o potencial de conversão de embriões somáticos (ES) das fases de desenvolvimento que poderão potenciar a conversão para uma nova planta ou seja ES cotiledonares, e ES com desenvolvimento apical que por uma questão de simplificação foram designados ES germinados no ápice.

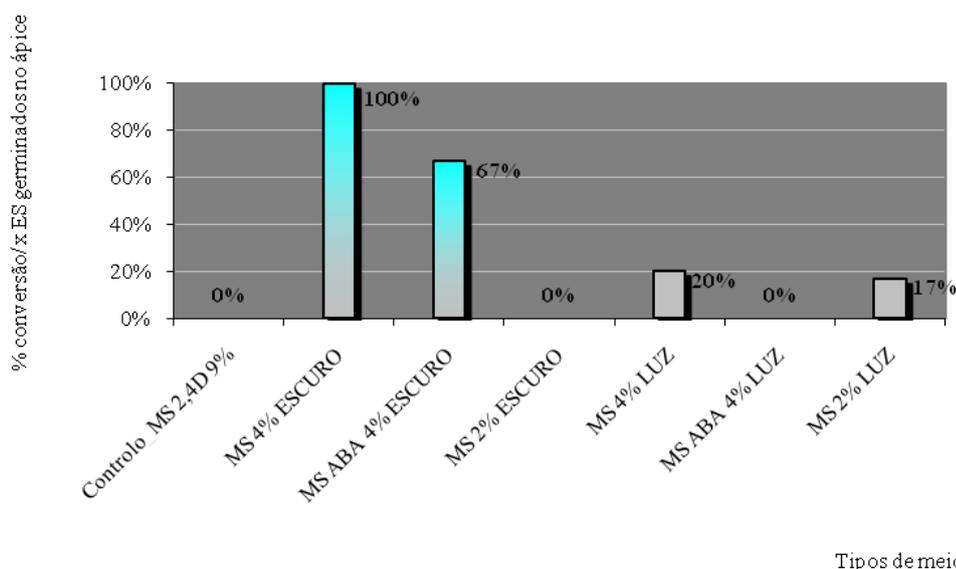
Procedeu-se ao ensaio descrito capítulo 2., secção 2.5.2.2. e a avaliou-se a percentagem de conversão por número de embriões somáticos normais, em fase cotiledonar e por número de embriões somáticos normais germinados no ápice, para cada ensaio de indução inicial.

As figuras que se seguem mostram os resultados obtidos após 8 semanas de cultura. De salientar que a percentagem de conversão a partir de embriões somáticos normais em fase cotiledonar é muito semelhante em todos os tratamentos em que ocorreu alguma conversão, estando a percentagem de conversão compreendida entre os valores de 13 a 22% (Fig.23).



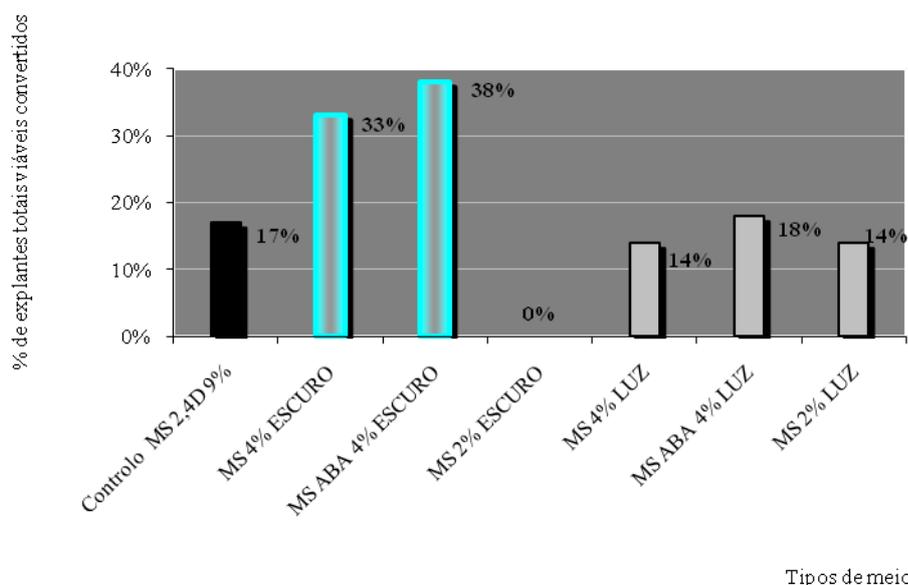
**Figura 23** – Percentagem de conversão de embriões somáticos por número embriões somáticos (ES) normais, em fase cotiledonar.

Relativamente, à percentagem de conversão a partir de embriões somáticos germinados no ápice já é visível uma diferença significativa nos tratamentos de indução inicial em meio MS com 4% de sacarose e com, ou sem, ABA, no escuro com percentagens de conversão de 67% e 100%, respectivamente (Fig.24).



**Figura 24** – Percentagem de conversão de embriões somáticos por número de embriões somáticos (ES) normais germinados no ápice.

Avaliando a percentagem de conversão global, por meio de cultura, verifica-se que a maior percentagem foi obtida nos tratamentos de indução inicial em meio MS com 4% de sacarose e com, ou sem, 2 mg/L ABA, no escuro escuro - (respectivamente, 33% e 38% (EST. VII e VIII B e C). Todos os tratamentos com indução de embriogénese somática à luz apresentam resultados de conversão muito semelhantes ao tratamento controlo, 17% (EST.VII e VIII A, E, F e G). Apenas o tratamento de indução inicial em meio MS com 2% sacarose no escuro, não apresenta qualquer taxa de conversão de embriões somáticos em plântulas (Fig.25, EST. VII e VIII D).



**Figura 25** – Percentagem global de explantes viáveis convertidos.

## ESTAMPA VII

Desenvolvimento dos embriões germinados no ápice em diferentes meios de cultura. **A** – Desenvolvimento de embrião somático germinado no ápice, induzido em meio MS 1mg/L 2,4-D e 9% sacarose, no escuro (1.3x); **B** – Desenvolvimento de embrião somático germinado no ápice, induzido em meio MS 4% sacarose, no escuro (1.8x); **C** – Desenvolvimento de embrião somático germinado no ápice, induzido em meio MS 2mg/L ABA e 4% sacarose, no escuro (1.9x); **D** – Desenvolvimento de embrião somático germinado no ápice, induzido em meio MS 2% sacarose, no escuro (1.7x); **E** – Desenvolvimento de embrião somático germinado no ápice, induzido em meio MS 4% sacarose, sob fotoperíodo (1x); **F** – Desenvolvimento de embrião somático germinado no ápice, induzido em meio MS 2mg/L ABA e 4% sacarose, sob fotoperíodo (1x); **G** – Desenvolvimento de embrião somático germinado no ápice, induzido em meio MS 2% sacarose, sob fotoperíodo (1x).



## ESTAMPA VIII

Desenvolvimento dos embriões somáticos normais, em fase cotiledonar nos diferentes meios de cultura. **A** – Desenvolvimento de embrião somático em fase cotiledonar, induzido em meio MS 1mg/L 2,4-D e 9% sacarose, no escuro (1x); **B** – Desenvolvimento de embrião somático em fase cotiledonar, induzido em meio MS 4% sacarose, no escuro (1.8x); **C** – Desenvolvimento de embrião somático em fase cotiledonar, induzido em meio MS 2mg/L ABA e 4% sacarose, no escuro (3x); **D** – Desenvolvimento de embrião somático em fase cotiledonar, induzido em meio MS 2% sacarose, no escuro (2x); **E** – Desenvolvimento de embrião somático em fase cotiledonar, induzido em meio MS 4% sacarose, sob fotoperíodo (1.2x); **F** – Desenvolvimento de embrião somático em fase cotiledonar, induzido em meio MS 2mg/L ABA e 4% sacarose, sob fotoperíodo (1.8x); **G** – Desenvolvimento de embrião somático em fase cotiledonar, induzido em meio MS 2% sacarose, sob fotoperíodo (2x).



### 3.4. Estudo do efeito da dessecação na indução de embriogênese somática em feijoa e tamarilho

Este trabalho experimental teve como principal objectivo analisar o efeito do stress, neste caso a dessecação, na indução de embriogênese somática em feijoa e em tamarilho.

Em feijoa, a experiência decorreu durante 10 semanas, enquanto que no tamarilho o trabalho prático decorreu durante 15 semanas. Os ensaios foram analisados qualitativamente, em ambas as espécies, de 5 em 5 semanas.

#### 3.4.1. Feijoa

Após as 5 semanas de indução de embriogênese somática de todos os tratamentos, foi possível observar já algum desenvolvimento embrionário somático, principalmente com o aparecimento de algumas protuberâncias na região cotiledonar dos embriões zigóticos (Fig.26).



**Figura 26** – Embrião zigótico de feijoa, após dessecação (1 dia) e 5 semanas de cultura em meio MS 9% sacarose.

Aquando das 10 semanas de cultura, apenas eram visíveis embriões somáticos maduros em três dos tratamentos nomeadamente nos embriões zigóticos que foram sujeitos a um dia de dessecação e colocados nos dois tipos de meio de cultura testados, e nos embriões zigóticos que foram sujeitos a três dias de dessecação e foram colocados em meio MS com 9% sacarose (EST IX A e B). Os tratamentos em que os embriões zigóticos foram sujeitos a 1 e 3 dias de dessecação colocados em meio MS com 9% sacarose, formaram um elevado número de embriões somáticos em fases precoces de desenvolvimento (Tab.4), (EST IX C e D).

O maior número de explantes sem qualquer tipo de desenvolvimento somático foi observado quando o seu meio de cultura continha 1mg/L de 2,4-D (EST IX E e F).

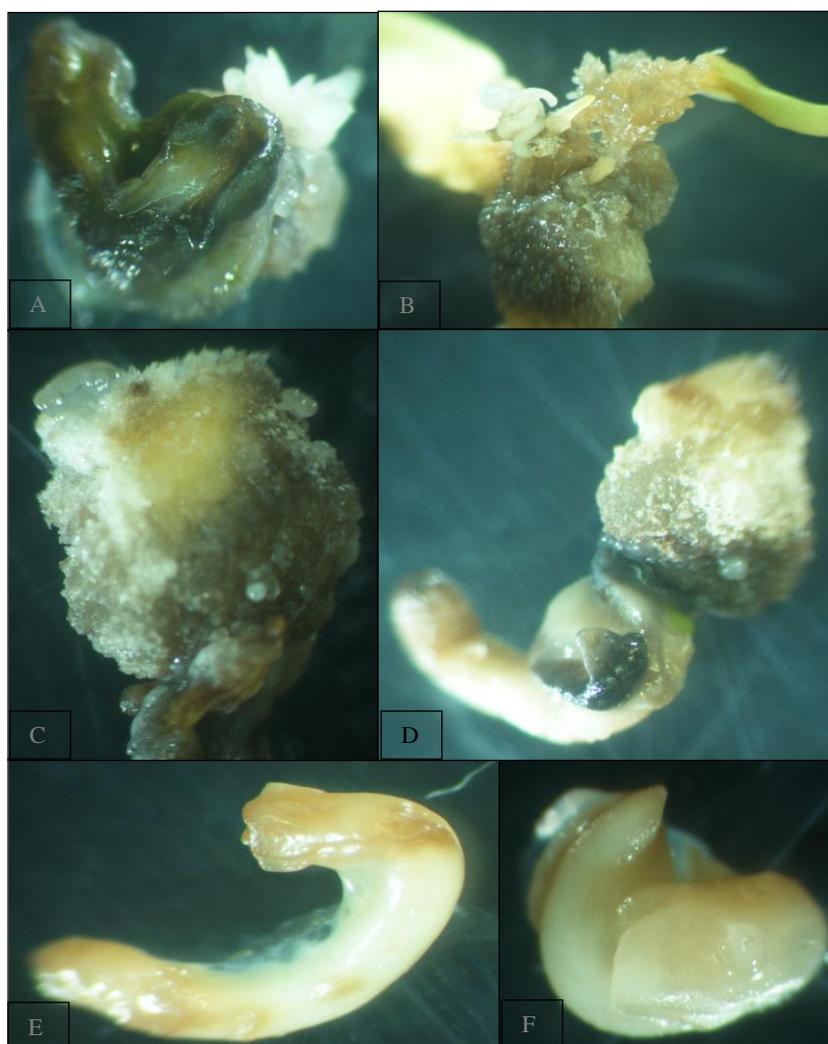
**Tabela 4** – Número de embriões somáticos em diferentes fases de desenvolvimento de acordo com o respectivo tratamento de indução em stresse, após 10 semanas de cultura (N=20 embriões).

Tratamentos	Escuro	1º dia dessecação/ Escuro		3º dia dessecação/ Escuro		7º dia dessecação/ Escuro	
		MS 2,4D 1mg/L 9% sacarose	MS 9% sacarose	MS 2,4D 1mg/L 9% sacarose	MS 9% sacarose	MS 2,4D 1mg/L 9% sacarose	MS 9% sacarose
<b>Tipo de resposta</b>	MS 2,4D 1mg/L 9% sacarose	MS 9% sacarose	MS 2,4D 1mg/L 9% sacarose	MS 9% sacarose	MS 2,4D 1mg/L 9% sacarose	MS 9% sacarose	MS 2,4D 1mg/L 9% sacarose
<b>ES em fase de desenvolvimento avançado</b>	0	1	1	0	0	3	0
<b>ES em fase de desenvolvimento inicial</b>	4	11	3	9	1	8	2
<b>Sem embriões somáticos</b>	16	8	16	11	19	9	18

A ANOVA dos dados obtidos, mostra que há diferenças entre as médias da amostragem ( $p=0.00$ ,  $\alpha=0,05$ ). Contudo, é importante perceber se as diferenças são significativas em relação ao controlo. Para isso foi realizado o teste de comparações múltiplas de Dunnett, a partir do qual foi possível perceber que estatisticamente há diferenças significativas entre os explantes dos tratamentos de 1 e 7 dias de dessecação em meio de cultura MS com 9% sacarose e o tratamento controlo (todos valores P ( $0.017$  e  $0.048$ , respectivamente)  $> \alpha=0,05$ ). Os restantes tratamentos não apresentam diferenças significativas comparativamente ao tratamento controlo (todos valores  $P > \alpha=0,05$ ).

## ESTAMPA IX

Estado dos embriões zigóticos de feijoa, ao fim de 10 semanas de cultura. **A e B** – Embriões somáticos ao fim de 10 semanas de cultura (2.4x e 1.8x, respectivamente); **C e D** – Embriões somáticos em fase de desenvolvimento inicial ao fim de 10 semanas de cultura (2.6x e 1.6x, respectivamente); **E e F** – Ausência de embriões somáticos ao fim de 10 semanas de cultura (3x e 3.2x, respectivamente).



### 3.4.2. Tamarilho

Depois de 5 e 10 semanas de indução de embriogénese somática foi possível observar indução de embriogénese somática apenas nos tratamentos em meio MS com 1mg/L 2,4-D e 9% de sacarose e no tratamento com 1 dia de dessecação em meio MS com 1mg/L 2,4-D e 9%. Nos restantes tratamentos não se verificou qualquer tipo de indução e apenas foi visível uma alteração da coloração dos explantes (EST. X).

Após as 15 semanas de cultura os resultados mantiveram-se. Contudo, em ambos os casos acima referidos foi possível verificar o aparecimento não só de calo embriogénico mas também de massas celulares embriogénicas que poderão corresponder a algumas fases de desenvolvimento de embriões somáticos (Tab.5, EST.XI A e B).

O maior número de explantes sem qualquer tipo de indução foi observado nos seguintes tratamentos: 1 dia de dessecação em meio de cultura MS com 9% sacarose; e 2 e 3 dias de dessecação nos dois tipos de meio de cultura testados (Tab.5, EST.XI E e F).

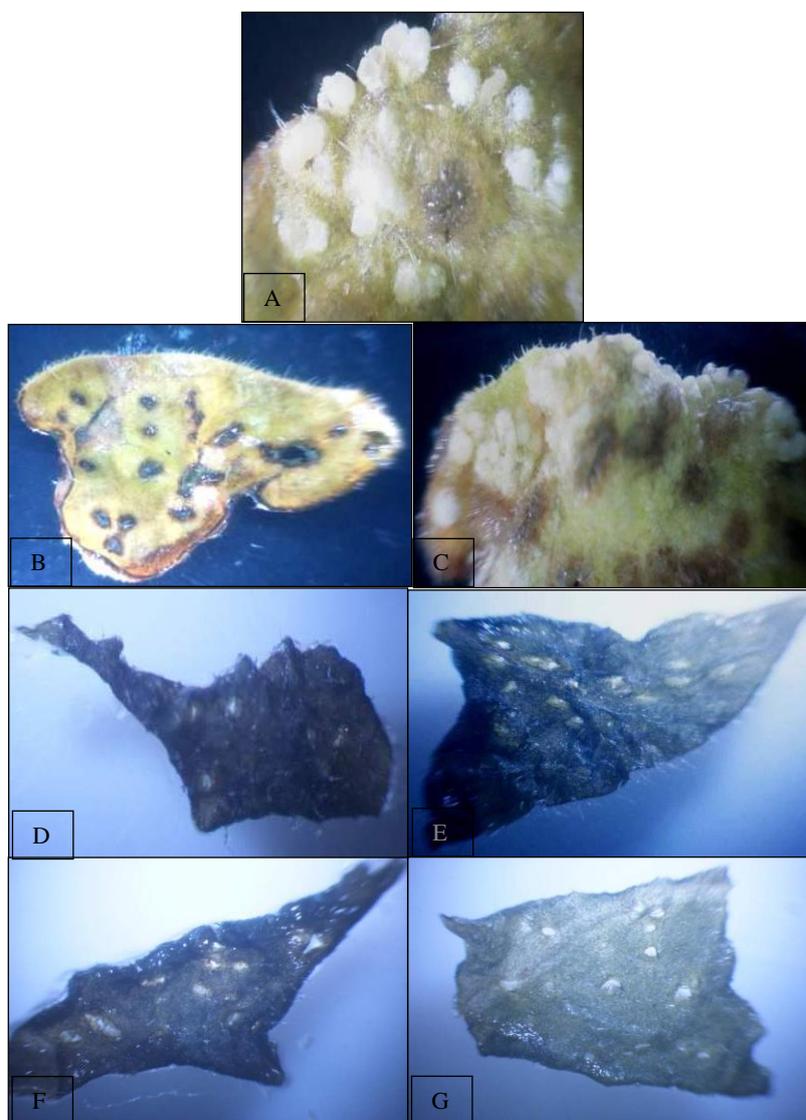
Foi efectuada a análise estatística dos dados. Realizou-se uma ANOVA de uma via, de onde se pôde concluir que há diferenças entre as médias da amostragem. O teste de comparações múltiplas de Dunnett, permitiu concluir que apenas no tratamento de 1 dia de dessecação em meio MS com 2,4-D e 9% sacarose não há diferenças significativas entre este e o tratamento controlo ( $P(1,00) > \alpha=0,05$ ). Os restantes tratamentos apresentam diferenças significativas em relação ao controlo.

**Tabela 5** – Número de explantes em diferentes fases de desenvolvimento de acordo com o respectivo tratamento de indução em stress, após 10 semanas de cultura (N=28 embriões).

Tratamentos	Escuro	1º dia dessecação/Escuro		2º dia dessecação/Escuro		3º dia dessecação/Escuro	
		MS 2,4D 1mg/L 9% Sacarose	MS 2,4D 1mg/L 9% Sacarose	MS 9% Sacarose	MS 2,4D 1mg/L 9% Sacarose	MS 9% Sacarose	MS 2,4D 1mg/L 9% Sacarose
<b>Calo embriogénico (CE)</b>	13	0	17	0	0	0	0
<b>CE oxidado</b>	12	0	8	0	0	0	0
<b>Sem desenvolvimento</b>	3	28	3	28	28	28	28

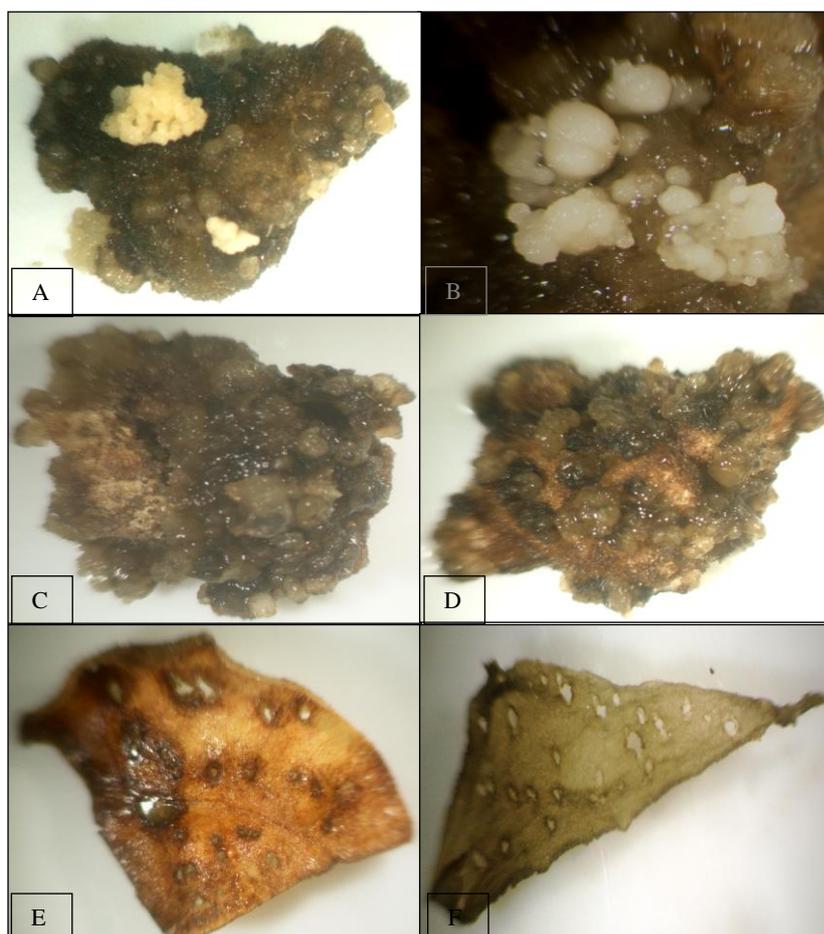
## ESTAMPA X

Desenvolvimento da folha, durante as primeiras 5 semanas de cultura. **A** – folha inoculada em meio MS 1mg/L 2,4-D e 9% sacarose, no escuro (2.4x); **B** – folha inoculada em meio MS com 9% sacarose, no escuro. Um dia de dessecação (1x); **C** – folha inoculada em meio MS com 1mg/L 2,4-D e 9% sacarose, no escuro. Um dia de dessecação (1.3x); **D** – folha inoculada em meio MS com 9% sacarose, no escuro. Dois dias de dessecação. (2.8x); **E** – folha inoculada em meio MS com 1mg/L 2,4-D e 9% sacarose, no escuro. Dois dias de dessecação. (2.6x); **F** – folha inoculada em meio MS com 9% sacarose, no escuro. Três dias de dessecação. (3.8x); **G** – folha inoculada em meio MS com 1mg/L 2,4-D e 9% sacarose, no escuro. Três dias de dessecação. (3.4x).



## ESTAMPA XI

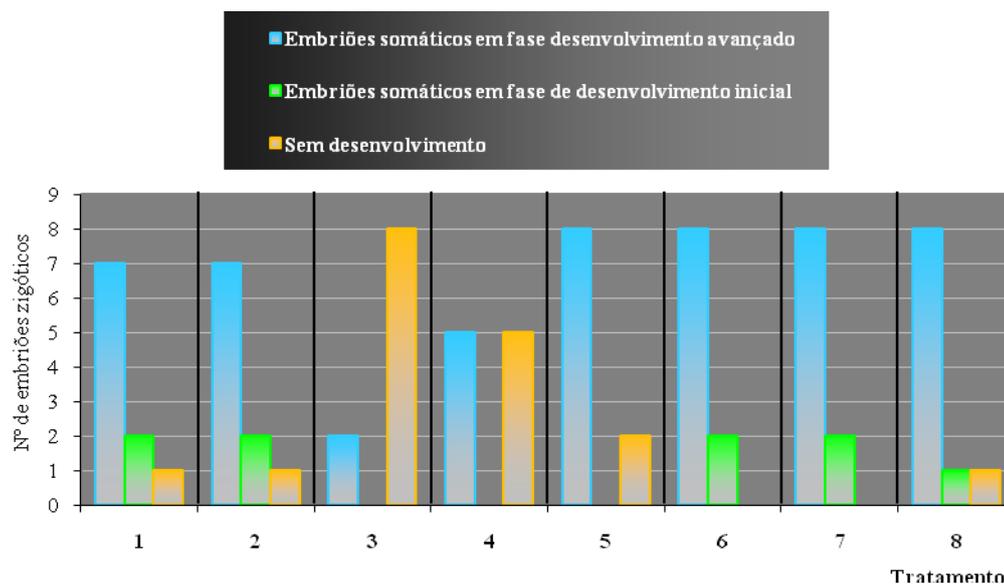
Estado do material após as 15 semanas de cultura. **A e B** – Calo embriogénico ao fim de 15 semanas de cultura (1.6x e 3.6x, respectivamente); **C e D** – Calo embriogénico oxidado ao fim de 15 semanas de cultura (1.8x e 1.8x, respectivamente); **E e F** – Ausência de calo embriogénico ao fim de 15 semanas de cultura (1.2x e 1x, respectivamente).



### 3.5. Estudo do efeito da concentração da auxina 2,4-D no meio de cultura, na indução de embriogénese somática em feijoa

Este estudo teve como objectivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de 2,4-D, ao longo de 8 semanas, no escuro, na indução de embriogénese somática a partir de embriões zigóticos de feijoa, via directa.

O ensaio decorreu durante 8 semanas. No fim da experiência foi efectuada uma análise qualitativa e quantitativa dos resultados.



**Figura 27** – Número de embriões zigóticos com diferentes fases de desenvolvimento de embriogénese somática, de acordo com os tratamentos aplicados (capítulo 2, secção 2.7).

Quer nos tratamentos iniciados com a inoculação de embriões zigóticos em meio MS com 1mg/L 2,4-D e 9% sacarose (tratamentos: 1, 2 e 5), quer nos tratamentos iniciados com a inoculação de embriões zigóticos em meio MS com 0,5 mg/L 2,4-D e 9% sacarose (tratamentos: 6, 7 e 8), ao fim de 8 semanas, foi possível observar embriões somáticos em fase de desenvolvimento avançado (EST.XII A e B). O tratamento 3 (meio inicial MS com 1mg/L 2,4-D e 9% sacarose) apresentou um elevado número de embriões zigóticos sem qualquer desenvolvimento somático (EST.XII E e F). Já no tratamento 4, também iniciado em meio de indução MS com 1mg/L 2,4-D e 9% sacarose, o número de explantes que deram origem a embriões somáticos em fase avançada de desenvolvimento é igual ao número de explantes que não tiveram qualquer desenvolvimento somático (Fig.27).

Nos tratamentos 1, 2, 6, 7 e 8 foi possível observar o aparecimento de embriões somáticos em fases iniciais de desenvolvimento, contudo, nos tratamentos 3, 4 e 5, todos

com indução iniciada em meio MS com 1mg/L 2,4-D e 9% sacarose, os estádios de desenvolvimento embrionário somático iniciais não foram visíveis (Fig.27).

Nos tratamentos 6 e 7 todos os explantes inoculados formaram embriões somáticos. Como já foi referido, ambos os tratamentos tiveram início em meio MS com 0,5mg/L 2,4-D e 9% sacarose tendo os explantes sido, posteriormente, transferidos para meio com menor concentração de 2,4-D (0,25 mg/L), na semana 4 e 2, respectivamente (Fig.27).

Pelo tratamento estatístico foi possível apurar que há homogeneidade de variâncias. No entanto, segundo ANOVA de uma via, foi possível verificar diferenças significativas entre os tratamentos ( $p=0.00 < \alpha=0.05$ ).

## ESTAMPA XII

Estado do material ao fim de 8 semanas de cultura. **A e B** – Embriões somáticos ao fim de 8 semanas de cultura (2.2x e 2.4x, respectivamente); **C e D** – Embriões somáticos em fase de desenvolvimento inicial ao fim de 8 semanas de cultura (2x e 1.8x, respectivamente); **E e F** – Explantes em que não se verificou a formação de embriões somáticos ao fim de 8 semanas de cultura (2x e 2.4x, respectivamente).



#### 4. DISCUSSÃO e CONCLUSÕES

A embriogénese somática é um método de multiplicação de plantas *in vitro* que permite a clonagem de genótipos particulares (Thorpe & Stasolla, 2001). No entanto, um processo eficaz de regeneração de plantas por embriogénese somática pressupõe que os embriões somáticos obtidos possam germinar de forma eficaz e ser convertidos em plantas (Canhoto, 2010; Yang & Zhang, 2010). Isto significa, em termos práticos, que os embriões somáticos não devem ter anomalias morfológicas ou fisiológicas e devem sofrer um processo de desenvolvimento e maturação tão semelhante aos respectivos embriões zigóticos quanto possível de forma a garantir a eficácia do processo (Ikeda & Kamada, 2005). No entanto, esta situação nem sempre se verifica e em muitas espécies onde a indução de embriogénese somática tem sido conseguida verifica-se que o número de embriões produzidos é muito maior que o número de plantas final obtido, uma consequência de anomalias nos embriões e/ou de deficiências na germinação e conversão (Canhoto & Cruz, 1994; Canhoto & Cruz, 1996; Canhoto *et al.*, 1999; Yang & Zhang, 2010).

A feijoa e o tamarilho são duas espécies de plantas lenhosas para as quais foram estabelecidos protocolos eficazes de indução de embriogénese somática (Canhoto & Cruz,

1996; Lopes *et al.*, 2000; Canhoto *et al.*, 2005; Correia *et al.*, 2009; Correia & Canhoto, 2010). Estes protocolos permitem obter um grande número de embriões somáticos (Canhoto & Cruz 1994; Lopes *et al.*, 2000) e constituem bons modelos para a caracterização dos mecanismos de indução nestas espécies. No entanto, no que diz respeito à qualidade dos embriões, verifica-se que ela é por vezes reduzida, ocorrendo a formação de embriões com anomalias morfológicas, dificuldades de germinação e embriões precocemente germinados. Algumas destas anomalias podem ter a ver com deficiências na formação dos meristemas apicais do caule e da raiz durante o desenvolvimento embrionário mas podem ser igualmente o resultado de deficiências na correcta maturação dos embriões. Resultados preliminares obtidos nestas duas espécies mostraram que ao contrário das células dos embriões zigóticos, as células dos embriões somáticos se apresentam bastante vacuolizadas, sugerindo deficiências na acumulação de substâncias de reserva nos embriões somáticos que podem interferir com a sua ulterior germinação (Lopes *et al.*, 2000; Correia & Canhoto, 2010).

Com o objectivo de ultrapassar esta situação e de tentar compreender a que são devidas as reduzidas taxas de germinação dos embriões zigóticos foram realizados, no âmbito deste trabalho, ensaios de quantificação e análise histológica das substâncias de reserva bem como tentativas de promover um melhor amadurecimento dos embriões e consequente aumento das taxas de germinação e conversão em plantas.

Os resultados obtidos mostraram que os embriões somáticos de feijoa possuem quantidades muito mais reduzidas (cerca de 20x) de lípidos totais que os respectivos embriões zigóticos. Embora se tenham quantificado os lípidos totais dos dois tipos de embriões, as análises histológicas mostram que uma grande parte do volume celular é preenchida por corpos lípidicos o que indica que a maior parte dos lípidos analisados serão, de facto, lípidos de reserva. Durante o desenvolvimento do embrião zigótico um grande número de espécies acumula lípidos como compostos de reserva nas células embrionárias durante a fase de maturação (Bewley & Black, 1994). Estes lípidos são depois mobilizados durante as fases iniciais da germinação e da conversão dos embriões em plântulas. Esta acumulação de lípidos parece estar relacionada com um controlo hormonal exercido pelo ácido abscísico (Thomas & Jiménez, 2005). Deste modo, os baixos teores de lípidos observados nos embriões somáticos quer em termos quantitativos (análise bioquímica) quer qualitativos (análise histológica) parecem sugerir que as condições de cultura utilizadas para a indução de embriogénese na feijoa e tamarilho não são as mais adequadas, sendo talvez necessário proceder a uma mais correcta maturação dos embriões através de

tratamentos com ABA ou com outros agentes que têm sido descritos na literatura como promotores da maturação, caso por exemplo de uma elevada osmolaridade (Dodeman *et al.*, 1997; von Arnold *et al.*, 2002; Rose *et al.*, 2010).

No que diz respeito à análise das proteínas totais, as secções histológicas realizadas nos cotilédones de embriões somáticos e zigóticos mostraram também que os vacúolos proteicos eram de dimensões mais reduzidas nas células dos embriões somáticos que nos zigóticos. No entanto, a quantificação proteica mostrou que a discrepância entre os teores de proteínas entre embriões zigóticos e somáticos não era tão acentuada como no caso dos lípidos. Para além disso, verificou-se que, apesar dos cortes histológicos mostrarem que os vacúolos proteicos ocupam uma parte considerável do volume celular, o teor em proteínas é consideravelmente inferior ao teor em lípidos. Interessante também o facto da análise bioquímica mostrar que os teores de proteína em embriões zigóticos e somáticos de tamarilho são muito próximos, uma situação que não parece ser sustentada pelas análises histológicas pois verificou-se que as células dos embriões somáticos se apresentam bastante vacuolizadas e com vacúolos proteicos de menores dimensões. Uma explicação para os baixos teores em proteína obtidos pode estar relacionada com o facto das proteínas de reserva se encontrarem fortemente glicosiladas. Deste modo, os vacúolos proteicos aparecem como grandes áreas nas análises histológicas mas o teor em proteína desses vacúolos pode ser mais reduzido que aquilo que se poderia supor. A comprovar este facto parece estar a observação de que os vacúolos proteicos também coram com a técnica do PAS, específica para hidratos de carbono. A diferença entre os teores de proteína observados em feijoa (4,6% de peso fresco) e no tamarilho (2,9%) está de acordo com a maior densidade dos corpos proteicos de feijoa quando observados ao microscópio. De facto, os vacúolos proteicos de tamarilho apresentam algumas zonas claras que sugerem a digestão das proteínas de reserva ou uma deficiente acumulação proteica durante a maturação dos embriões zigóticos nesta espécie. Em alternativa pode especular-se que a digestão proteica possa começar a ocorrer ainda antes do processo de germinação se iniciar o que não parece ser fisiologicamente muito provável. Mais difícil de explicar é a proximidade entre os níveis de proteína detectados em embriões zigóticos e somáticos de tamarilho e as diferenças observadas nos vacúolos proteicos a nível histológico. De facto, nas células dos embriões somáticos de tamarilho verifica-se que os vacúolos proteicos têm dimensões diminutas que não justificam os níveis de proximidade em relação aos teores de proteína relativamente aos embriões zigóticos. Esta situação poderá eventualmente ser

explicada por uma alteração na forma como as proteínas estão presentes nas células dos embriões somáticos, podendo a sua acumulação não se limitar aos vacúolos proteicos.

Em relação ao amido, os cortes histológicos e coloração com o PAS não permitiram identificar grãos de amido nos embriões zigóticos de tamarilho e feijoa. A técnica utilizada permite a coloração dos vacúolos proteicos provavelmente devido à glicosilação das proteínas aí existentes, como já foi referido. Hidratos de carbono presentes na parede celular, nomeadamente a celulose, são também corados por esta técnica. Isto significa que o amido não se encontra entre as reservas acumuladas pelos embriões zigóticos destas duas espécies. Pelo contrário, nos embriões somáticos foi detectada, a nível histoquímico a presença de grãos de amido, com maior incidência no caso do tamarilho mas também em feijoa. Esta acumulação de amido nos embriões somáticos revela uma alteração profunda na organização celular das células dos embriões somáticos e que pode ser o resultado da presença de elevadas concentrações de sacarose nos meios de indução de embriogénese. De facto, alguns autores têm referido uma relação entre a concentração de sacarose presente no meio de cultura e a formação de grãos de amido nos plastídeos das células em cultura (Yeung, 1995; Thorpe & Stasolla, 2001). No caso particular do amido, a quantificação bioquímica indicou a presença de elevadas concentrações de amido nos embriões zigóticos de feijoa. Também em feijoa, Pescador *et al.* (2008) detectaram igualmente a presença de amido em embriões somáticos, em particular nas fases torpedo e cotiledonar da embriogénese. Este tipo de reserva estava também presente nos embriões zigóticos mas em teores muito mais reduzidos. Uma vez que no presente trabalho o amido não foi detectado a nível histológico isso significa, provavelmente, que aquilo que foi quantificado foi na realidade outro tipo de hidrato de carbono, como por exemplo os hidratos de carbono associados às proteínas dos vacúolos proteicos, outros hidratos de carbono insolúveis como celulose e/ou hidratos de carbono solúveis. Estes dados necessitam de confirmação ulterior.

No seu conjunto, os resultados permitem concluir que se verifica uma deficiente acumulação de compostos de reserva nos embriões somáticos de feijoa e tamarilho que certamente ajuda a explicar, pelo menos em parte, as reduzidas taxas de obtenção de plantas nestas espécies quando comparadas com o elevado número de embriões que é possível obter. Deste modo, torna-se necessário otimizar as condições de maturação dos embriões somáticos de forma a tornar o processo mais rentável. O facto de embriões somáticos de feijoa induzidos (4 semanas) em meio com 2,4-D e 9% de sacarose e em seguida transferidos para meio sem hormonas e com 2% de sacarose (4 semanas)

apresentarem teores mais elevados de lípidos (8%) que aqueles mantidos continuamente na presença de 2,4-D e 9% de sacarose durante 8 semanas (2,9% de lípidos) indica que a manipulação da hormona e da fonte de carbono pode permitir alcançar taxas de embriogénese somática normal mais elevadas que até aqui.

Com o objectivo de aumentar as taxas de indução de embriogénese somática foram feitos alguns ensaios com modificações dos meios de cultura e do tipo de explante inoculado. A maior parte destes ensaios foi realizado em feijoa por ser um sistema experimental mais fácil de analisar uma vez que a formação e desenvolvimento dos embriões somáticos ocorre num único meio com auxina. Já no caso do tamarilho são necessários dois meios de cultura, um para indução e outro para desenvolvimento, o que torna o desenho experimental e a análise dos resultados mais complexa.

Num dos ensaios fez-se variar o tipo de explante utilizado. Assim, para além de embriões zigóticos isolados e intactos foram cultivadas sementes e sementes cortadas, utilizando-se sempre o 2,4-D como factor de indução. Os resultados mostram que quando se utilizaram sementes intactas os níveis de indução foram mais baixos provavelmente devido ao facto do tegumento impedir o contacto dos tecidos com a auxina. Esta situação indica que os embriões zigóticos intactos continuam a ser o material mais adequado para a indução de embriogénese embora o processo de isolamento seja moroso e necessite de algum treino, situação que poderia ser ultrapassada se as sementes intactas respondessem de forma eficaz. No entanto, o facto da cultura das sementes segmentadas permitir obter resultados semelhantes aos obtidos com os embriões zigóticos isolados é já um passo importante na melhoria da eficiência do processo.

Nos ensaios em que se reduziu o tempo de contacto com o 2,4-D a 4 semanas, altura em que os embriões somáticos já estão formados (Canhoto & Cruz, Correia & Canhoto, 2010), e depois se procedeu à sua transferência para meios sem 2,4-D e em que se fez variar a concentração de sacarose (2 ou 4%), luminosidade (luz/escuro) e ABA (presença ou ausência), os resultados mostraram que o ABA, ao contrário do que tem sido referido para outras espécies (Thorpe & Stasolla, 2001), não promove um mais eficaz desenvolvimento dos embriões, o mesmo se verificando com a luz. De facto, as melhores frequências de indução foram conseguidas pela simples transferência dos embriões para meios sem 2,4-D, com concentrações de sacarose mais baixas e mantendo-se as condições de escuro. Deste modo, a osmolaridade do meio parece ser o componente que mais condiciona o desenvolvimento dos embriões no caso da feijoa, uma situação que também se verifica durante o desenvolvimento dos embriões zigóticos, onde a osmolaridade dos

tecidos que rodeiam o embrião se vai progressivamente reduzindo (Ikeda & Kamada, 2005; Von Arnold, 2008). De referir ainda que estas condições, em particular quando se testou o meio com 4% de sacarose, foram as que permitiram obter um maior número de embriões e um número mais elevado de plantas regeneradas a partir dos embriões somáticos. Como já foi referido, deve sublinhar-se o aumento dos teores de lípidos após passagem do meio com 2,4-D e elevada concentração de sacarose (9%) para meio sem hormona e com baixos teores de sacarose, sugerindo que estes tratamentos promovem de facto uma melhor maturação dos embriões somáticos. Estudos posteriores devem incidir sobre a caracterização morfológica dos embriões nos diferentes tratamentos de forma a verificar se o número de embriões que atinge o estado cotiledonar é também condicionado pela osmolaridade do meio. A transferência dos embriões para a luz numa fase do desenvolvimento embrionário parece desaconselhável não só por a eficácia da embriogénese não ser melhor mas também porque os embriões e as plântulas deles resultantes acumulam pigmentos antociânicos que em algumas espécies parecem estar associados ao aparecimento de variação somaclonal (von Arnold, 2008) uma situação indesejável quando se pretende a clonagem de determinados genótipos.

Com o objectivo de verificar se outros factores para além das auxinas são capazes de promover a indução de embriogénese, testou-se a dessecação dos explantes seguida da sua cultura em meio com ou sem 2,4-D. Os resultados indicaram claramente que a embriogénese no caso da feijoa pode ser conseguida sem a interferência de hormonas vegetais, e que um dia de dessecação é suficiente para desencadear a resposta. Resultados anteriores também em feijoa já tinham mostrado que outros tipos de stress como valores de pH extremos e baixas temperaturas eram igualmente capazes de induzir embriogénese somática (Canhoto *et al.*, 2009). Esta situação significa que diferentes tipos de estímulos (hormonas, dessecação, pH, temperatura) devem activar uma via de transdução de sinal comum cujo resultado final é a desprogramação das células e o desencadear de um desenvolvimento de tipo embrionário. Em alternativa pode acontecer que cada um destes estímulos actue em vias diferentes mas cujo resultado final seja o mesmo, ou seja a activação de genes envolvidos na embriogénese. Qual o tipo ou tipos de vias e genes envolvidos não é conhecido embora alguns genes tenham já sido identificados como estando envolvidos no despoletar da embriogénese (Yang & Zhang, 2010). No tamarilho os resultados da dessecação não permitiram obter qualquer tipo de resposta embriogénica. Esta situação relaciona-se provavelmente com o tipo de explante utilizado. No caso do tamarilho os explantes utilizados foram folhas, sendo estas muito sensíveis à dessecação.

De facto, enquanto os embriões zigóticos são estruturas com um conteúdo hídrico muito baixo que facilmente suportam períodos prolongados de dessecação, mesmo quando separados do tegumento, as folhas, quando isoladas do resto da planta rapidamente perdem teores elevados de água que podem levar à sua degenerescência. É provável que os tratamentos aplicados no caso do tamarilho (1 – 3 dias) ultrapasse o limite daquilo que as folhas podem suportar e tenha comprometido a viabilidade celular. O facto das folhas com apenas um dia de dessecação apresentarem uma menor taxa de degenerescência parece comprovar o que foi dito. Deste modo, importa testar períodos de stress mais reduzidos ou outros tipos de stress.

A análise futura dos níveis de hormonas, em particular auxinas e ácido abscísico, no decurso do processo de embriogénese pode ajudar a melhor compreender o mecanismo de indução de embriogénese somática na feijoa.

**6. BIBLIOGRAFIA**

- Aderkas, P. V. & Bonga, J. M. 2000. Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. *Tree Physiology*, 20: 921-928.
- Akhtar, N., Kumari, N., Pandey, S., Ara, H., Singh, M., Jaiswal, U., Jaiswal, V. & Jain, S. 2000. Somatic embryogenesis in tropical fruit trees. In: Jain, S. M., Gupta, P. K. & Newton, R. J. (Eds.) *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, Kluwer Academic Publishers, Vol. 6, pp. 93-140.
- Alvelos, M. R., Cruz, G. S. & Canhoto, J. M. 2002. Somatic embryogenesis in zygotic embryos of feijoa induced by pH pulses. XIII Congresso Nacional de Bioquímica, Lisboa.
- Alvelos, M. R. 2003. Ensaio para otimizar a indução e desenvolvimento de embriões somáticos em *Pinus pinaster* Aiton e *Feijoa sellowiana* Berg. Tese de Mestrado, Departamento de Botânica da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.
- Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J. & Filonova, L. 2002. Developmental Pathways for Somatic Embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69: 233-249.

- Atkinson, R. G. & Gardner, R. C. 1993. Regeneration of transgenic tamarillo plants. *Plant Cell. Rep.*, 12: 347-351.
- Barghchi, M. 1986. *In vitro* rejuvenation of *Cyphomandra betacea* (tamarillo). Plant Physiology Division Biennial Report, Department of Scientific and Industrial Research (DSIR), New Zealand, pp.52.
- Barghchi, M. 1998. *In vitro* Regeneration, Plant Improvement and Virus Elimination of Tamarillo [*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt]. In: Davey, M. R., Alderson, P. G., Lowe, K. C., Power, J. B., Eds. Tree Biotechnology – Towards the Millennium. Nottingham. Nottingham University Press, pp. 173-185.
- Batygina, T. B. 2002. Embryology of flowering plants. Terminology and concepts. Vol. 1: Generative Organs of Flower. Science Publishers, Inc. Enfield, USA.
- Berleth, T. & Chatfield, S. 2002. Embryogenesis: Pattern formation from a single cell. The *Arabidopsis* Book. American Society of Plant Biologists.
- Bewley, J. D. & Black, M. 1994. Seeds – Physiology of Development and Germination (2<sup>nd</sup> Ed.). Plenum Press, New York.
- Bhojwani, S. S., Mullins, K. & Cohen, D. 1987. Micropropagation of *Feijoa sellowiana* Berg. *Acta Horticult.*, 212: 69-76.
- Bois, D. 1927. Les Plantes Alimentaires, vol I. Paris, Ed. Paul Lechevalier.
- Bozhkov, P. V., Filonova, L. H. & Suarez, M. F. 2005. Programmed Cell Death in Plant Embryogenesis. *Current Topics in Developmental Biology*, 67: 135-179.
- Bradford, M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Bronner, R. 1975. Simultaneous demonstration of lipids and starch in plant tissue. *Stain Technology*, 50: 1-4.
- Buvat, R. 1989. Ontogeny, Cell Differentiation and Structure of Vascular Plants. Springer-Verlag. Berlin.
- Cangahuala-Inocente, G. C., Steiner, N., Santos, M. & Guerra, M. P. 2004. Morphohistological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. *Protoplasma*, 224: 33-40.

- Cangahuala-Inocente, G. C., Dal Vesco, L. L., Steinmacher, D., Torres, A. C. & Guerra, M. P. 2007. Improvements in somatic embryogenesis protocol in *Feijoa (Acca sellowiana)* (Berg) Burret): induction, conversion and synthetic seeds. *Scientia Horticulturae*, 111: 228-234.
- Cangahuala-Inocente, G. C., Steiner, N., Maldonado, S. B. & Guerra, M. P. 2009. Patterns of protein and carbohydrate accumulation during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana*. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 44: 217-224.
- Canhoto, J. M. 1994. *Feijoa sellowiana* Berg. (Myrtaceae): Estudos Sobre Embriogênese e Outros Tipos de Morfogênese. Tese de Doutorado, FCTUC.
- Canhoto, J. M. & Cruz, G. S. 1994. Improvement of somatic embryogenesis in *Feijoa sellowiana* Berger (Myrtaceae) by manipulation of the induction and regeneration media. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant*, 30: 21-25.
- Canhoto, J. M. & Cruz, G. S. 1996. Histodifferentiation of somatic embryos in cotyledons of pineapple guava (*Feijoa sellowiana* Berg). *Protoplasma*, 191: 34-45.
- Canhoto, J. M. & Cruz, G. S. 1996. *Feijoa sellowiana* Berg (Pineapple Guava). In: Bajaj, Y. P. S. (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 35 – Trees IV*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 155-171.
- Canhoto, J. M., Cruz, G. S. & Mesquita, J. F. 1996. Ultrastructural changes in cotyledons of Pineapple Guava (Myrtaceae) during somatic embryogenesis. *Ann. Bot.*, 78: 513-521.
- Canhoto, J. M., Lopes, M. L. & Cruz, G. S. 1999. Somatic embryogenesis in Myrtaceous plants. In: S. M. Jain, P.K. Gupta e R.J. Newton (Eds.) *Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Vol.4*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 293-340.
- Canhoto, J. M., Lopes, M. L. & Cruz, G. S., 1999. Somatic embryogenesis and plant regeneration in Myrtle (Myrtaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 57: 13-21.
- Canhoto, J. M. 2005. Androgênese e obtenção de haplóides. *Biol. Veg e Agro- Industrial*, 2: 35-54.
- Canhoto, J. M., Lopes, M. L. & Cruz, G. S. 2005. Protocol for Somatic Embryogenesis: Tamarillo (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.). In: Jain, S. M., Gupta, P. K., Eds. *Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody plants*. Dordrecht, Springer, pp. 379-389.

- Canhoto, J. M., Rama, S. & Cruz, G. S. 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration in carob (*Ceratonia siliqua* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant*, 42: 514-519.
- Canhoto, J. M., Correia, S. I. & Marques, C. I. 2009. Factors Affecting Somatic Embryogenesis Induction and Development in *Feijoa sellowiana* Berg. *Acta Hort.* 839: 147-156.
- Canhoto, J. M. 2010. *Biocologia Vegetal – da clonagem de plantas à manipulação genética*. Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra (in press).
- Capron, A., Chatfield, S., Provar, N. & Berleth, T. 2009. Embryogenesis: pattern formation from a single cell. *The Arabidopsis Book*. Rockville, MD: American Society of Plant Biologists. (versão on-line: <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>)
- Carloto, J. M. G. 2000. *Estudo de Processos Moleculares Associados à Embriogénese Somática em Cyphomandra betacea*. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.
- Chawla, H. S. 2009. *Introduction to Plant Biotechnology* (3<sup>rd</sup> Ed). Science Publishers, Inc., Enfield, NH, USA.
- Chrispeels, M. J. & Sadava, D. E. 2003. *Plants, Genes and Crop Biotechnology* (2<sup>nd</sup> Ed). Cap.5. pp. 100-123.
- Christianson, M.L. & Warnick, D.A. 1988. Organogenesis *in vitro* as a developmental process. *HortScience*, 23: 515-519.
- Chug, A. & Khurana, P. 2002. Gene expression during somatic embryogenesis – recent advances. *Current Science*, 83: 715-730.
- Cohen D. & Elliot, D. 1979. Micropropagation methods for blueberries and tamarillos. *Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 29: 177-179.
- Cohen, D., van den Brink, R. C., MacDiarmid, R. M., Beck, D. L. & Forster, R. L. S. 2000. Resistance to tamarillo mosaic virus in transgenic tamarillos and expression of the transgenes in F1 progeny. *Acta Horticult.*, 521: 43-49.
- Correia, S. I. 2007. *Embriogénese somática em Feijoa sellowiana* Berg.: caracterização do suspensor. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

- 
- Correia, S. I., Lopes, M. L. & Canhoto, J. M. 2009. Somatic embryogenesis in tamarillo (*Cyphomandra betacea*): recent advances. *Acta Horticult.*, 839: 157-164.
- Correia, S. I. & Canhoto, J. M. 2010. Characterization of somatic embryo attached structures in *Feijoa sellowiana* Berg. (Myrtaceae). *Protoplasma*, 242: 95–107.
- Correia, S. I., Lopes, M. L. & Canhoto, J. M. 2010. Biotechnology of tamarillo. In: D. Thangadurai (Ed.), *Molecular Agrobiology*, Bentham Science Publishers, USA (in press).
- Cruz, G. S., Canhoto, J. & Abreu, M. A. 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of *Feijoa sellowiana* Berg. *Plant Science*, 66: 263-270.
- Cruz, F. P. & Tomé, M. C. 2007. *Agrobacterium*-mediated transformation of tamarillo plants. *Proc. of Plant Transformation Technology*. Vienna, Austria.
- Dal Vesco, L. & Guerra, M. 2000. The effectiveness of nitrogen sources in *Feijoa* somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64: 19-25.
- De Jong, A. J., Schmidt, E. D. & De Vries, S. C. 1993. Early events in higher-plant embryogenesis. *Plant Mol. Biol.*, 22: 367-620.
- Dodeman, V.L., Ducreux, G. & Keis, M. 1997. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *J. Exp. Bot.*, 48: 1493-1509.
- Dudits, D., Györgyey, J., Bögre, L. & Bakó, L. 1995. Molecular biology of somatic embryogenesis. In: T.A. Thorpe (Ed.), *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 267-308.
- Dawes, S. N. & Pringle, G. L. 1983. Subtropical Fruit from South and Central America. In: Wratt, G. S., Smith, H. C., Eds. *Plant Breeding in New Zealand*. Wellington, Butterworths, pp. 123-138.
- De Rosso, V. V. & Mercadante, A. Z. 2007. HPLC-PDA-MS/MS of anthocyanins and carotenoids from dovyalis and tamarillo fruits. *J Agric. Food Chem.*, 55: 9135-9141.
- Dodeman, V. L., Ducreux, G. & Kreis, M. 1997. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *J. Exp. Bot.* 48: 1493–1509
- Duarte, O. & Alvarado, E. 1997. Tratamientos para mejorar la propagación del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* Sendt.) por semillas y estacas. *Proc. Interamerican Society Tropical Hort.*, 41: 248-251.

- Emons, A. M. 1994. Somatic embryogenesis: cell biological aspects. *Acta Bot. Neerl.*, 43: 1-14.
- Emons, A. M. & De Does, H. 1993. Origin and Development of embryo and bud primordial during maturation of embryogenic calli of *Zea mays* L. *Can. J. Bot.*, 71: 1349-1356.
- Fachinello, J. C. & Nachtigal, J. C. 1992. Propagação da goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana* Berg.), através da mergulhia de cepa. *Scientia Agrícola*, 49: 37- 39.
- Fehér, A., Pasternak, T. P. & Dudits, D. 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74: 201-228.
- Fernando, J. A., Melo, M., Soares, M. & Appezzato-da-Glória, B. 2001. Anatomy of Somatic Embryogenesis in *Carica papaya* L.. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 44: 247-255.
- Figueroa, F., Avalos, R. & Vargas, V. 2006. Embryo production trough somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86: 285-301.
- Firml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwartz, H., Hamann, T., Offringa, R. & Jürgens, G. 2003. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical basal axis of *Arabidopsis*. *Nature*, 426: 147-153.
- Fowke, L. C., Attree, S. M., Wang, H. & Dunstand, D. I. 1990. Microtubule organization and cell division in embryogenic protoplast cultures of white spruce (*Picea glauca*). *Protoplasma*, 158: 86-94.
- Ferreira, M. L., Lopes, M. L., Veríssimo, P. C., Canhoto, J. M. & Cruz, G. S. 1998. Somatic embryogenesis in leaves of *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn.: histological and biochemical studies. *Abst. IX International Cong. on Plant Tissue Cell Culture*, Jerusalem: Israel.
- Gaj, M. D. 2004. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation*, 43: 27-47.
- Garcês, H. M. 2006. *Kalanchoe daigremontiana* and *Arabidopsis thaliana* as models to understand plant morphogenesis. Tese de Doutorado. Departamento de Biologia Vegetal da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

- Gatita, I. C. & Almeida, J. 2003. Micropropagación del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn.), Solanaceae silvestre usada en la alimentación humana. *Revista Forest Venez.*, 47: 9-13.
- Geier, T. 1980. PAS – positive reaction of phenolic inclusions in plant cell vacuoles. *Histochemistry and Cell Biology*, 65: 167-171.
- Giri, C. C., Shyamkumar, B. & Anjaneyulu, C. 2004. Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. *Trees*, 18: 115-135.
- Gressler, E., Pizo, M. A. & Morellato, P. C. 2006. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. *Revista Brasil Bot.*, 29: 509-530.
- Guerra, M. P., Torres, A. C., & Teixeira, J. B. 1999. Embriogénesis Somática e Sementes Sintéticas. In: Torres, A.C., Caldas, L.S. e Buso, J.A. (Eds.). *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília, Embrapa- CBAB., v.2., pp. 533-568.
- Guerra, M. P., Dal Vesco, L., Ducroquet, J. P., Nodari, R. O. & Reis, M. 2001. Somatic Embryogenesis in goiabeira serrana: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. *R. Bras. Fisiol. Veg.*, 13: 117-128.
- Guimarães, M. L., Tomé, M. C. & Cruz, G. S. 1996. *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sedtn. (Tamarillo). In: Bajaj, Y.P.S., Ed. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* vol. 35, Trees IV. Berlin, Springer Verlag, pp. 120-137.
- Guimarães, M. L., Cruz, G. S. & Montezuma-de-Carvalho, J. M. 1988. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. *Plant Cell, Tissue and Organ Cultur.*, 15: 161-167.
- Harada, J. J. & Kwong, R. W. 2001. Plant Embryogenesis (Zygotic and Somatic). *Encyclopedia of Life Sciences*, Nature Publishing Group. (versão on-line: <http://www.els.net>).
- Hartmann, H., Kester, D. E., Davies, F. T. & Geneve, R. L. 1997. *Plant propagation: principles and practices* (6<sup>th</sup> Ed.). Prentice-Hall International. London.
- Heatherbell, D. A., Reid, M. S. & Wrolstad, R. E. 1982. The tamarillo: chemical composition during growth and maturation. *New Zealand Journal of Science*, 25: 239-243.

- Ho, W. J. & Vasil, J. K. 1983. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). I. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. *Protoplasma*, 118: 169-180.
- Hooker, J. D. 1899. *Cyphomandra betacea*. *Curtis's Bot. Mag.*, 55: 7682.
- Hurtado, N. H., Morales, A. L., González-Miret, M. L., Escudero-Gilete, M. L. & Heredia, F. J. 2009. Colour, pH stability and antioxidant activity of anthocyanin rutinosides isolated from tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). *Food Chem.*, 117: 88-93.
- Ikeda, M. & Kamada, J. 2005. Comparison of molecular mechanisms of somatic and zygotic embryogenesis. In: A. Mujib & J. Samaj (Eds.), *Somatic embryogenesis*. Springer, Berlin, pp. 51-68.
- Irninger, M. 2003. A Evolução da Agricultura – da Idade Média à Era Pré-industrial. In: Os Genes e a Alimentação. E. V. Schärer – Züblin (Ed.) *Foundation Alimentarium*, pp. 38-46.
- Jain, S. M. & Gupta, P. K. 2005. *Protocols for Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Springer, Berlin.
- Jensen, W. A. 1962. *Botanical Histochemistry – Principles and Practice*. W. H. Freeman and Company, San Francisco.
- Jiménez, V. 2005. Involvement of plant hormones and plant growth regulators in *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation*, 47: 91-110.
- Johri, B. M., Ambegaokar, K. B. & Srivastava, P. S. 1992. *Comparative Embryology of Angiosperms*. Vol.1., Springer – Verlag, Berlin.
- Jürgens, G. 2001. Apical-basal pattern formation in *Arabidopsis* embryogenesis. *The EMBO Journal*, 20: 3609-3616.
- Khosh-Khui, M., Shekafandeh, A. & Azarakhsh, H. 1984. Micropropagation of Myrtle. *Sci. Hort.*, 22: 139-146.
- Koltunow, A. M. & Grossniklaus, U. 2003. Apomixis: a developmental perspective. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 54: 547-574.
- Komamine, A., Murata, N. & Nomura, K. 2005. Mechanisms of somatic embryogenesis in carrot suspension cultures – morphology, physiology, biochemistry and molecular biology. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 41: 6-10.

- Kou, M., Yen, J., Hong, J. & Wang, C. 2008. *Cyphomandra betacea* Sendt. Phenolics protect LDL from oxidation and PC12 cells from oxidative stress. *LWT – Food Sci. Technol.*, 42: 458-463
- Krikorian, A. D. 2000. Historical insights into some contemporary problems in somatic embryogenesis. In: Jain, S. M., Gupta, P. K. & Newton, R. J. (Eds.) *Somatic Embryogenesis in woody plants*. Kluwer Academic Publishers. Vol. 6, pp. 17-49.
- Laux, T. & Jürgens, G. 1994. Establishing the body plan of the *Arabidopsis* embryo. *Acta Bot. Neerl.*, 43: 247-260.
- Laux, T. & Jürgens, G. 1997. Embryogenesis: a new start in life. *Plant Cell*, 9: 989-1000.
- Laux, T., Würschum, T. & Breuninger, H. 2004. Genetic Regulation of Embryonic Pattern Formation. *Plant Cell*, 16: 190-202.
- Levine, M. 1947. Differentiation of Carrot Root Tissue Grown in Vitro. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 74: 321-328.
- Lewis, D. H. & Considine, J. A. 1999. Pollination and fruit set in tamarillo (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, Vol. 27: 101-112.
- Litz, R. E. 1984. In vitro responses of adventitious embryos of two polyembryonic *Eugenia* species. *HortScience*, 19: 720-722.
- Litz, R. E. 1984. In vitro somatic embryogenesis of jaboticaba, *Myrciaria cauliflora*. *HortScience*, 19: 62-64.
- Liu, C.; Xu, Z. H. & Chua, N. H. 1993. Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *Plant Cell*, 5: 621-630.
- Liu, C. 2004. *Plant Embryogenesis*. (versão on-line: <http://www.plant.wageningenur.nl>)
- Lopes, M. L., Ferreira, M. R., Carloto, J. M., Cruz, G. S. & Canhoto, J. M. 2000. Somatic embryogenesis induction in Tamarillo (*Cyphomandra betacea*). In: Jain, S. M., Gupta, P. K. & Newton, R. J. (Eds.). *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, Vol. 6. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 433-455.
- Mattos, J. R. 1969. O género *Feijoa* Berg. *Arqs. Bot. Est. S. Paulo*, 4: 263-267.

- Mazia, D., Brewer, P. A. & Alfert, M. 1953. The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromophenol blue. *Biol. Bull.*, 104: 57-67.
- McCane, J. & Widdowson, D. A. 1992. In: *Fruit and nut. (Suppl. To the composition of foods.)* 5<sup>th</sup> Ed. London, Holland, Unwin & Buss, pp. 74-77.
- McComb, J. A. & Hodges, T. K. (1986) *Eucalyptus (Eucalyptus spp.)*. In: Bajaj, Y. P. S. (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol.1. Trees I.* Springer-Verlag, Berlin, pp. 340-362.
- McCready, R. M., Guggolz, J., Silviera, V. & Owens, H. S. 1950. Determination of Starch and Amylose in Vegetables. *Analytical Chemistry*, 22: 1156-1158
- McManus, J. F. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol.*, 23: 99-108.
- Meinke, D. W. 1995. Molecular genetics of plant embryogenesis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 46: 369-394.
- Meinke, D. W. 1996. Embryo-defective mutants of *Arabidopsis*: cellular functions of disrupted genes and developmental significance of mutant phenotypes. In: Wang, T. L. & Cuming, A. (Eds.) *Embryogenesis – the generation of a plant.* Bios Scientific Publishers, Oxford, pp. 33-50.
- Merkle, S. A., Parrot, W. A. & Flinn, B. S. 1995. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: T.A. Thorpe (Ed.), *In vitro embryogenesis in Plants.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 155-203.
- Monteiro, M. T. 2002. A influência do cálcio na indução de embriogênese somática em *Feijoa sellowiana* Berg. Tese de Mestrado. Departamento de Botânica da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.
- Mordhorst, A. P., Toonen, M. A. & de Vries, S. C. 1997. Plant Embryogenesis. *Critical Review in Plant Sciences*, 16: 535-576.
- Mossop, D. W. 1977. Isolation, purification and properties of tamarillo mosaic virus, a member of the potato virus Y group. *N Z J Agr. Res.*, 20: 535-541.
- Muralidharan, E. M., Gupta, P. K. & Mascarenhas, A. F. 1989. Plantlet production through high frequency somatic embryogenesis in long term cultures of *Eucalyptus citriodora*. *Plant Cell Rep.*, 8: 41-43.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.

- Naylor, E. 1932. The Morphology of Regeneration in *Bryophyllum calycinum*. American Journal of Botany, 19: 32-40.
- Nugent, G., Chandler, S. F., Whiteman, P. & Stevenson, T. W. 2001. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 67: 85-88.
- Obando, M., Goreux, A. & Jordan, M. 1992. Regeneration *in vitro* de *Cyphomandra betacea* (tamarillo), una especie frutal andina. Ciencia e Investigacion Agrária, 19: 125-130.
- Obando, M. & Jordan, M. 2001. Regenerative responses of *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (tamarillo) cultivated *in vitro*. Acta Horticult., 560: 429-432.
- Okahisa, Y., Yoshimura, T. & Imamura, Y. 2005. Na application of the alkaline extraction – glucoamylase hydrolysis method to analyze starch and sugar contents of bamboo. J. Wood Sci., 51: 542-545.
- Ozias-Akins, P. 2006. Apomixis: Developmental Characteristics and Genetics. Critical Reviews in Plant Sciences, 25: 199-214.
- Pais, M. S. S. 2003. Biotecnologia Vegetal. In: Lima, N. e Mota, M. (Eds.) Biotecnologia – Fundamentos e Aplicações. Lidel. Lisboa, pp. 401-427.
- Palavan-Unsal, N., Buyuktuncer, E. & Tufekci, M. 2005. Programmed cell death in plants. Journal of Cell and Molecular Biology, 4: 9-23.
- Park, S. & Harada, J. 2008. *Arabidopsis* embryogenesis. In: Suárez, M. F. & Bozhkov, P. V. (Eds.), Plant embryogenesis. Humana Press, New Jersey, pp. 1-16.
- Parra, R. & Amo-Marco, J. B. 1989. Secondary somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle (*Myrtus communis* L.). Plant Cell Rep., 18: 325-330.
- Pedroso, M. C. & Pais, M. S. 1998. A scanning electron microscopy and X-ray microanalysis study during induction of morphogenesis in *Camellia japonica* L. Plant Science, 87: 99-108.
- Pescador, R., Kerbauy, G. B., Kraus, J. E., Ferreira, W. M., Guerra, M. P. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. 2008. Changes in soluble carbohydrates and starch amounts during somatic and zygotic embryogenesis of *Acca sellowiana* (Myrtaceae). In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant, 44: 289-299.

- Pescador, R., Kerbauy, G. B., Viviani, D. & Kraus, J. E. 2008. Anomalous somatic embryos in *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret (Myrtaceae). *Revista Brasil. Bot.*, 1: 155-164.
- Pescador, R., Kerbauy, G. B., Strassburg, R. C. & Kraus, J. E. 2009. Structural aspects of the zygotic embryogenesis of *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret (Myrtaceae). *Acta bot. bras.* 23: 136-144.
- Prohens, J. & Nuez, F. 2001. The tamarillo (*Cyphomandra betacea*): a review of a promising small fruit crop. *Small Fruits Review*, 1: 43-68.
- Raghavan, V. & Sharma, K. K. 1995. Zygotic embryogenesis in gymnosperms and angiosperms. In: T.A. Thorpe (Ed.), *In vitro embryogenesis in Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 73-115.
- Raghavan, V. 1997. *Molecular Embryology of Flowering Plants*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Raghavan, V. 1986. *Embryogenesis in Angiosperms – A developmental and experimental study*. Cambridge University Press, London.
- Raghavan, V. 2000. *Developmental Biology of Flowering Plants*. Springer, New York.
- Raghavan, V. 2006. *Double fertilization – embryo and endosperm development in flowering plants*. Springer, Berlin.
- Reis, E. 2004. Estudo de fenóis durante a indução de embriogénese somática em *Feijoa sellowiana* Berg. (Myrtaceae). Tese Mestrado, Departamento de Botânica da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.
- Reis, E., Batista, M. T. & Canhoto, J. M. 2008. Effect and analysis of phenolic compounds during somatic embryogenesis induction in *Feijoa sellowiana* Berg. *Protoplasma*, 232: 193–202
- Rose, R. & Nolan, K. 2006. Genetic regulation of somatic embryogenesis with particular reference to *Arabidopsis thaliana* and *Medicago truncatula*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant*, 42: 473-481.
- Rose, R. J., Mantiri, F. R., Kurdyukov, S., Chen, S-K., Wang, X.-D., Nolan, K. E. & Sheahan, M. B. 2010. Developmental biology of somatic embryogenesis. In: Pua, E.-C. & Davey, M. R. (Eds.), *Plant Developmental Biology – Biotechnological perspectives*, Vol. 2. Springer, Berlin, pp. 3-26.

- Rotundo, A., Raffone, C. & Rotundo, S. 1981. Una prova di cultura del tamarillo in Campania. *Frottilcoltura*, 43: 41-46.
- Schmidt, D. L., Guzzo, F., Toonen, M. A. & De Vries, S. C. 1997. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development*, 124: 2049-2062.
- Sharma, K. K. & Thorpe, T. A. 1995. Asexual embryogenesis in vascular plants in nature. In: T.A. Thorpe (Ed.), *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 17-72.
- Sharp, W. R., Söndahl, M. R., Caldas, L. S. & Maraffa, S. B. 1980. The physiology of in vitro asexual embryogenesis. *Horticult. Reviews*, 2: 268-310.
- Singh, H. 1978. *Embryology of Gymnosperms*. Gebrüder Borntraeger, Berlin.
- Skoog, F. & Miller, C. O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultivated in vitro. In: *Biological Action of Growth Substances*. Symp. Soc. Exp. Biol., 11: 118-131.
- Smith, B. D. 1995. *The Emergence of Agriculture*. Scientific American Library. New York.
- Souter, M. & Lindsey, K. 2000. Polarity and signalling in plant embryogenesis. *Journal of Experimental Botany*, 51: 971-983.
- Stasolla, C. & Yeung, E. C. 2003. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74: 15-35.
- Stefanello, S., Dal Vesco, L., Ducroquet, J. P., Nodari, R. O. & Guerra, M. P. 2005. Somatic embryogenesis from floral tissues of feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg.). *Scientia Horticulturae*, 105: 117-126.
- Steward, F. C., Mapes, M. O. & Mears, K. 1958. Growth and organized development of cultured cells. II Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Am. J. Bot.*, 45: 705-708.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 2006. *Plant Physiology* (4<sup>th</sup> Ed) Sinauer Associates, Inc. Sunderland.
- Taurus, T. E., Lulsdorf, M. M., Kikcio, S. I. & Dunstan, D. I. 1992. Bioreactor culture of *Picea mariana* Mill. (black spruce) and the species complex *Picea glauca-engelmannii* (interior spruce) somatic embryos. Growth parameters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38: 46-51.

- Taylor, R. L. 1967. The foliar embryos of *Maxus paludosa*. *Can. J. Bot.*, 45: 1553-1556.
- Termignoni, R., Wang, P. J. & Hu, C. Y. 1996. Somatic embryo induction in *Eucalyptus dunnii*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 45: 129–132.
- Thomas, C. & Jiménez, V. M. 2005. Mode of action of plant hormones and plant growth regulators during induction of somatic embryogenesis: molecular aspects. In: Mujib, A. & Samaj, J. (Eds.), *Somatic embryogenesis*. Springer, Berlin, pp. 157-176.
- Thorpe, T. A. & Stasolla, C. 2001. Somatic embryogenesis. In: Bhojwani, S. S. & Soh, W. Y. (Eds.), *Current Trends in the Embryology of Angiosperms*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 279-336.
- Tomé, M. C., Guimarães, M. L. & Cruz, G. S. 1992. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. Abstr. 1<sup>st</sup> Congresso Hispano-Luso de Biotecnologia, Santiago de Compostela: Spain.
- Trigiano, R. N., Buckley, L. G. & Merkle, S. A. 1999. *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Vol.6. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 189-208.
- Trigiano, R. N. & Gray, D. J. 2005. *Plant Development and Biotechnology*. CRC Press. Boca Raton. pp. 145-157.
- Trindade, M. H. 1996. *Eucalyptus globulus* Labill: Systems for in vitro regeneration. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Trindade, M. H. & Pais, M. S. 2003. Meristematic nodule culture: a new pathway for in vitro propagation of *Eucalyptus globulus*. *Trees*. 17: 308-315.
- von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J. & Filonova, L. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69: 233–249
- von Arnold, S. 2008. Somatic embryogenesis. In: George, E. F., Hall, M. A., De Klerk, D. (Eds) *Plant propagation by tissue culture: volume 1. The background*, 3<sup>rd</sup> Ed. Springer, Dordrecht, pp. 335–354
- Vuotto, M. L., Basile, A., Moscatiello, V., De Sole, P., Castaldo-Cobianchi, R., Laghi, E. & Ielpo, M.T. 1999. Antimicrobial and antioxidant activities of Feijoa sellowiana fruit. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 13: 197-201.
- Wardlaw, C. W. 1955. *Embryogenesis in Plants*. Methuen & Co. LTD, London.

- Watt, M. P., Blakeway, F., Cresswell, C. F. & Herman, B. 1991. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis*. South Afr. For. J., 157: 59-65.
- Westhoff, P., Jeske, H., Jurgens, G.; Kluppstech, K. & Link, G. 1998. Molecular Plant Development – from gene to plant. Oxford University Press.
- Williams, E. G. & Maheswaran, G. 1986. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. Ann Bot., 57: 443-462.
- Yadegari, R., Paiva, G. R., Laux, T., Koltumov, A. M., Apuya, N., Zimmerman, J. L., Fisher, R. L., Harada, J. J. & Goldberg, R. B. 1994. Cell differentiation and morphogenesis are uncoupled in *Arabidopsis raspberry* embryos. Plant Cell, 6: 1713-1729.
- Yang, X. & Zhang, X. 2010. 'Regulation of Somatic Embryogenesis in Higher Plants', Critical Reviews in Plant Sciences, 29: 1, 36-57.
- Yarbrough, J. A. 1932. Anatomical and developmental studies of the foliar embryos of *Bryophyllum calycinum*. Am. J. Bot., 19: 443-453.
- Yeung, E. C. 1995. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: Thorpe, T. A. (Ed.), In Vitro Embryogenesis in Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 205-247.
- Zimmerman, J. L. 1993. Somatic Embryogenesis: A Model of Early Development in Higher Plants. Plant Cell, 5: 1411-1423.
- Zöllner, N. & Kirsch, K. 1962. Über die quantitative Bestimmung von Lipoiden (Mikromethode) mittels der vielen natürlichen Lipoiden (allen bekannten Plasmalipoiden) gemeinsamen Sulphosphovanillin-Reaktion. Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin, 135: 545-561.