



Ana Sofia Simões Pereira

Micropropagação de *Acca sellowiana* (Berg.):
Optimização da indução de embriogénese somática
e estabelecimento de novos genótipos

Dissertação de mestrado em Biotecnologia Vegetal e Biodiversidade,
orientada pela Professor Doutor Jorge Pataca Canhoto e apresentada ao Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra.

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Micropropagação de *Acca sellowiana* (Berg.): Optimização da indução de embriogénese somática e estabelecimento de novos genótipos

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre Biotecnologia Vegetal e Biodiversidade em 2016, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Jorge Pataca Canhoto (Universidade de Coimbra).

Ana Sofia Simões Pereira

2016

Apoios:

FCT
Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CIÊNCIA



COMPETE
PROGRAMA OPERACIONAL FACTORES DE COMPETITIVIDADE

QR
EN
QUADRO
DE REFERÊNCIA
ESTRATÉGICO
NACIONAL
PORTUGAL 2007.2013



AGRADECIMENTOS

Relembrando o percurso deste ano para a conclusão da minha dissertação não poderia ficar indiferente a algumas pessoas que se demonstraram fundamentais ao bom desempenho deste trabalho. Assim sendo gostaria de agradecer:

Ao meu orientador Professor Doutor Jorge Canhoto, pelo apoio científico, por toda a orientação, pela revisão, pela compreensão, pela confiança e autonomia que depositou em mim durante este meu percurso.

Às minhas amigas Daniela Dinis e Lucie de Sousa por toda a amizade, ajuda, apoio e disponibilidade.

À minha família, por toda a sua paciência, apoio, que me prestaram.

Não posso deixar de agradecer também a pessoas como a Sandra Correia, o João, a Ana Alves e a Dona Isabel pela ajuda no laboratório e disponibilidade que revelaram.

Aos restantes colaboradores do laboratório que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os meus amigos de Coimbra, Anadia e Condeixa, em especial à Cristina Costa e à Clara Mira pelo carinho, amizade e força que me transmitiram ao longo deste percurso.

Ao Billy pela ajuda na tradução do Resumo.

Ao Martinho, Anabela, Auzenda, Sónia, Tânia, Ana Ferraz e à Lassalete, pela paciência, apoio e compreensão que tiveram comigo no decorrer da dissertação.

Índice

Abreviaturas.....	vii
Resumo.....	ix
Abstract.....	x
1.Introdução	
1.1. Contextualização.....	4
1.2. <i>Acca Sellowiana</i> (Berg.)	5
1.2.1. Distribuição.....	5
1.2.2. Descrição da espécie.....	6
1.2.3. Importância ecológica e económica.....	7
1.2.4.Fenologia.....	9
1.2.5. Factores limitantes.....	9
1.2.6. Processos de melhoramento.....	11
1.3. Biologia reprodutiva das plantas- Embriogénese zigótica.....	12
1.3.1. Micropropagação.....	14
1.3.2. Técnicas de micropropagação.....	14
1.3.3. Embriogénese somática em feijoa.....	16
1.3.4. Embriogénese zigótica e somática.....	18
1.3.5. Indução da embriogénese através de situações de stress.....	18
1.3.6. AGP (proteínas de arabinogalactano)	19
1.4. Objectivos.....	21
2. Material e métodos	
2.1. Material vegetal.....	24
2.1.1. Preparação do material vegetal.....	26
2.1.2. Esterilização das sementes.....	26
2.1.3. Meio de cultura.....	27
2.2. Germinação.....	29

2.2.1. Viabilidade de sementes.....	29
2.3. Estabelecimento.....	30
2.4. Embriogênese.....	31
2.4.1. Embriogênese “one-step” e “two-step”	32
2.4.2. Maturação dos embriões.....	34
2.4.3. Choque auxínico.....	34
2.4.4 Embriogênese através de AGP.....	35
2.4.5. Estudos morfológicos e histológicos.....	36
3. Resultados e discussão	
3.1.1. Germinação e viabilidade das sementes.....	40
3.2. Estabelecimento.....	45
3.3. Embriogênese.....	46
3.3.1. Embriogênese “one-step” e “two-step”	47
3.3.2. Maturação de embriões.....	48
3.3.3. Choque auxínico.....	50
3.3.4. Efeito do AGP na embriogênese somática.....	53
3.3.5. Estudos morfológicos e histológicos.....	57
4. Conclusões e perspectivas futuras.....	58
5. Referências bibliográficas.....	62

Abreviaturas:

2,4-D – Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

ABA – Ácido abscísico

AGPs – “Arabinogalactan proteins” (proteínas de arabinogalactano)

Am – Amido

CA – Choque auxínico

CE – Células epidérmicas

Cot – Cotilédones

dH₂O – Água destilada

ECA – Embriogénese contínua

ED – Embriogénese descontínua

En – Endosperma

ET – Embrião em fase Torpedo

Fig. – Figura

g – Grama

GPI – Glycosylphosphatidylinositol

h - Hora

H – Hipocótilo

HCl – Ácido Clorídico

IBA – Ácido-3-indolbutírico

ID – Identificação

KOH – Hidróxido de Potássio

l – Litro

M – Molar

mg – Miligrama

MS – Meio de cultura de Murashige & Skoog

PGR – “Plant Growth Regulators” (reguladores de crescimento vegetal)

p/v – peso / volume

R – Radícula

T – Tegumento

v/v – volume / volume

% - Percentagem

°C – Graus centígrados

Resumo

A *Acca sellowiana* ou *Feijoa sellowiana*, é uma árvore que tem vindo a ser estudada ao longo de várias décadas e revelado grandes potencialidades em diversas áreas de estudo, tais como farmacológicas, alimentares, ornamentais, ecológicas e até mesmo como modelo de estudo comparativo (embriogénese zigótica e embriogénese somática) do desenvolvimento embrionário em plantas superiores. No entanto, a reprodução de características de interesse e técnicas de melhoramento ainda estão um pouco aquém do desejável. Desta forma, foram estudadas diferentes técnicas de propagação, como a germinação de sementes, o estabelecimento de meristemas e cultivo de entrenós e a embriogénese somática. Esta última surgiu como o método mais eficaz de obtenção de réplicas a partir de um excerto da planta que no caso da feijoa são os cotilédones de embriões zigóticos. Apesar de se conseguir obter um grande número de clones a partir da embriogénese somática ainda há necessidade de otimizar os protocolos devido a limitações como a elevada produção de embriões anómalos e a variação somaclonal que condicionam a maturação e geração de plântulas. Deste modo delinearam-se vários estudos utilizando diferentes genótipos e métodos de indução como: embriogénese “two step”, choque auxínico e o uso de AGP na indução de embriogénese somática. A variação do genótipo revelou ser significativa em diferentes estudos e o método utilizando 2,4-D (“two-step”) revelou maior indução de calo com embriões, sendo que os embriões transferidos para o meio contendo 0,2 mg/l de 2,4-D mostraram uma maior capacidade de desenvolvimento em plântulas (0,25/calos). Os métodos em que se induziu embriogénese a partir de stress demonstraram capacidade embriogénica, podendo vir a ser uma alternativa de indução de embriogénese. Os embriões produzidos a partir deste método demonstraram um rápido desenvolvimento e uniformidade de estados, e ainda alguma facilidade no isolamento dos embriões somáticos a partir do calo sem que estes ficassem danificados.

Palavras-chave: *Acca sellowiana*, micropropagação, germinação, embriogénese somática, choque auxínico, maturação.

Abstract

Acca sellowiana or *Feijoa sellowiana* is a species that has been studied over several decades and has been showing great potential in various fields of study. Applied in pharmaceutical and food industries, it is also ornamental, ecological and even used as a comparative study model (embryogenesis zygotic and somatic embryogenesis) of embryonic development in higher plants. Nonetheless the reproduction of characteristics of interest and techniques used are still not as desired. Thus, various propagation techniques have been studied, such as the germination of seeds, the establishment of meristems, internode cultivation and somatic embryogenesis. The latter emerged as the most effective method of obtaining replicas from a plant extract, in this case feijoa cotyledons of zygotic embryos. Although a large number of clones were obtained from somatic embryogenesis protocol optimizations are still required due to limitations such as the high production of abnormal embryos and somaclonal variation that influence the maturation and generation of seedlings. Thus outlined are several studies using different genotypes and induction methods such as embryogenesis "two step" auxinic shock and the use of AGP in the induction of somatic embryogenesis. The variation of genotype was found to be significant in different studies and the method using 2.4D ("two-step") showed greater callus induction in embryos, and the embryos transferred into the medium containing 0.2 mg / l 2, 4D showed greater developmental capacity in seedlings (0.25 / callus). The methods that induce embryogenesis from stress show embryogenic capacity and may prove to be a embryogenesis induction alternative. The embryos produced from this method showed rapid and consistent results, yet still allowing the isolation of somatic embryos from callus without causing damaged.

Keywords: *Acca sellowiana*, micropropagation, germination, somatic embryogenesis, auxinic shock, maturation.

1. INTRODUÇÃO



1.1. Contextualização

Nos últimos anos o elevado interesse por frutos exóticos tem levado a uma maior procura e à valorização dos mesmos. A feijoa é uma árvore que apresenta um excelente potencial farmacêutico e económico devido às suas propriedades. A produção de feijoa num sistema agronómico ainda é bastante rudimentar assim como a selecção de características determinantes devido aos representantes da espécie apresentarem uma elevada variabilidade genética. Dessa forma, a fixação de características de interesse é dificultada tornando o processo de melhoramento mais lento. Uma vez que os métodos de propagação vegetativa convencionais são pouco eficientes e a viabilidade, conservação e vigor das sementes é um problema, surge a preocupação, assim como a necessidade de otimizar os meios de propagação desta espécie, bem como os seus processos de melhoramento. O uso de sementes posterior à colheita é a principal forma de obtenção de plântulas jovens, seja para fins de conservação *ex situ* como meio de multiplicar a espécie para uso direto bem como para a obtenção de populações segregantes para fins de melhoramento genético e outros estudos.

Tendo em conta essas limitações, as técnicas de cultura de tecidos vegetais constituem ferramentas que podem ser aplicadas para a micropropagação clonal em massa e a criação de genótipos superiores para a domesticação dessa espécie, indo de encontro aos objectivos pretendidos. Com este trabalho pretende-se otimizar a obtenção de embriões, assim como apostar em métodos alternativos de obtenção de embriões.

1.2. *Acca sellowiana* (Berg.)

A *Acca sellowiana* ou *Feijoa sellowiana*, mais conhecida como feijoa ou goiabeira-serrana deve o seu nome a Friedrich Sellow, botânico e naturalista, que a colheu no ano de 1819. Esta, no entanto, só foi descrita pela primeira vez mais tarde, em 1856, por Otto Karl Berg. Esta espécie pertence à família das mirtáceas que compreende 130 géneros e cerca de 4000 espécies (Souza & Lourenzi, 2005). Na família Myrtaceae os géneros mais conhecidos devido ao seu alto valor económico são o *Eucalyptus*, *Eugenia*, *Myrtus* e *Psidium*.

O género *Acca* é representado por 3 espécies *A. sellowiana*, *A. laniginosa* e *A. macrostena*, sendo que estas duas últimas são nativas dos Andes peruanos e os seus frutos não são comestíveis (www.catalogueoflife.org)

1.2.1. Distribuição

A feijoa é nativa do Brasil e Uruguai sendo também descrita a sua existência no Paraguai e Argentina (Fig. 1). Esta é frequentemente avistada nalguns locais do Brasil, apenas a altitudes superiores a 1000 metros, coexistindo com a espécie *Araucaria angustifolia* (Thorpe & Bielecki, 2002; Santos *et al.*, 2009).



Figura 1. Mapa de distribuição nativa e exótica da espécie *Acca sellowiana* (Fonte: Agroforestry database, 2009).

Como os dois géneros não apresentam diferenças que justifiquem a sua separação, atualmente aceita-se o nome *Acca sellowiana*, por ser o mais antigo (Mattos, 1986; Cacioppo, 1988; Ducroquet & Hickel, 1997).

1.2.2. Descrição da espécie

A feijoa caracteriza-se por ser uma árvore de porte pequeno, medindo entre 3 a 6 metros de altura. Apresenta folha persistente e um fuste ramificado especialmente em campo aberto (Ducroquet *et al.*, 2000). O tronco e ramos são lenhificados e cilíndricos de cor acinzentada, as folhas curtas e pecioladas, encontram-se dispostas de forma oposta e apresentam uma tonalidade verde escura e brilhante (Fig. 2D).

De acordo com a zona nativa da feijoa algumas das suas características fenotípicas variam significativamente. No Uruguai são visíveis feijoas com face abaxial branco-cinza e frutos com sementes pequenas comparativamente às feijoas encontradas no Brasil. Estas apresentam folhas de face abaxial verde-clara, pilosidade esbranquiçada curta e rala (Ducroquet *et al.*, 2000).

A flor é hermafrodita e apresenta 4 sépalas discretas e 4 pétalas brancas vistosas e carnudas, já os estames são de número indeterminado, longos e de cor avermelhada (Figs. 2A e B). (Agroforestry data base 2009; Mattos, 1986; Ducroquet & Ribeiro, 1991; Ducroquet *et al.*, 2000).

As flores são dos principais recursos da planta para atrair polinizadores como por exemplo, insetos e pássaros que se alimentam das pétalas e acabam por transportar pólen nas patas (Mattos, 1986; Ducroquet *et al.*, 2000; Stewart & Craig, 1989; Ducroquet & Hickel, 1997; Finardi, 2003).

Os frutos, de cor verde escura, apresentam uma forma oblonga ou arredondada de 5-8 cm de comprimento e 3-7 cm de largura (Fig. 2C). A casca pode ser lisa, semi-rugosa ou rugosa, sendo a sua espessura variável (França, 1991). As sementes encontram-se no centro do fruto, envolvidas pela polpa branca granulosa e translúcida. Os frutos, mesmo

antes de amadurecerem, emanam um forte e agradável aroma devido à libertação de compostos voláteis (Agroforestry, 2009).



Figura 2. (A,B) Flor da feijoa (C) fruto com corte transversal (D) árvore da feijoa no Jardim Botânico de Coimbra.

1.2.3. Importância Ecológica e Económica

A feijoa foi introduzida na Europa no final do século dezanove como planta ornamental, tendo só mais tarde chegado a Portugal (Ruberto & Tringali, 2004).

O principal interesse no estudo desta espécie incide sobretudo no potencial dos frutos. Estes para além de apresentarem um atrativo e característico sabor e aroma a

goiaba-ananás, são uma mais-valia a nível nutricional, uma vez que apresentam baixo valor calórico e elevado teor em iodo e vitamina C.

Para além das suas qualidades organoléticas, o fruto apresenta propriedades antioxidantes e anticancerígenas - os flavonóides presentes causaram apoptose em células tumorais em casos de leucemia (Bontempo *et al.*, 2007). O potencial antibiótico foi verificado não só no fruto como nos óleos essenciais extraídos (Basile *et al.*, 1997; Vuotto *et al.*, 2000; Nakashima, 2001; Motohashi *et al.*, 2000), através de extratos elaborados a partir da casca do fruto em testes com bactérias *Satphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosas*, fungos *Candida albicans*, *Candida glabrata* e sementes (Basile *et al.*, 1997; Lim, 2012).

O fruto pode ser consumido em fresco, cristalizado ou desidratado em pedaços, assim como usado na confeção de geleias, sumos, bebidas alcoólicas e gelados (Nagle, 2004; Thorp; Bielecki, 2002). As folhas, devido às suas propriedades medicinais podem ser utilizadas em infusões contra a desintéria e cólera (Cacciopo, 1998). As pétalas pelo seu agradável sabor podem ser consumidas em saladas e doces (Canhoto & Cruz, 1996a) ou simplesmente utilizadas em decoração de pratos.

Ecologicamente a feijoa tem um papel fundamental uma vez que as suas flores ao serem polinizadas principalmente por pássaros permite que as pétalas sirvam de complemento alimentar, albergando uma grande quantidade de espécies de aves (Sazima *et al.*, 2007).

No Brasil, o interesse na espécie prende-se com o facto das populações naturais estarem a ser ameaçadas pela expansão da fruticultura e pecuária, colocando em risco a manutenção da diversidade genética e consequentemente a extinção de alelos raros. Desta forma a manutenção de plantas nativas nas áreas de ocorrência natural pelos pequenos agricultores contribui de forma significativa para a conservação “on farm” da floresta (Santos *et al.*, 2002; Santos, 2009). Este aspeto é particularmente relevante tendo em conta a contínua e preocupante fragmentação do ecossistema natural no qual essa espécie se insere.

A feijoa é cultivada para fins comerciais em vários países, tais como França, Israel, Itália, Rússia, Colômbia, Estados Unidos e Nova Zelândia (Thorp & Bielecki, 2002).

Atualmente os maiores produtores de feijoa são a Nova Zelândia com 200 hectares e a Colômbia com 220 hectares (Thorp & Bielecki, 2002). A exploração comercial de goiaba-serrana pode ainda permitir oferta à população de uma nova alternativa de frutos. A feijoa foi introduzida na Europa no século dezanove, em França (Côte d'Azur),

sendo que em Portugal, não existe informação acerca da sua introdução, os exemplares mais antigos encontram-se no jardim botânico de Lisboa e datam do início do século XX (Canhoto&Cruz, 1996a).

1.2.4. Fenologia

A *Acca sellowiana* é uma árvore que tolera baixas temperaturas, apresenta um crescimento lento e a sua floração ocorre a partir do quarto ano. Apresenta elevado potencial ornamental devido à sua folhagem bicolor com vistosa floração.

Em Portugal a floração inicia-se em Abril prolongando-se até finais de Maio dando frutos em Outubro (Canhoto, 1994 Canhoto&Cruz,1996a).

1.2.5. Factores limitantes

Nos últimos anos a demanda por sementes ou mudas de espécies florestais nativas, tanto para recomposição ambiental quanto para comercialização de produtos, tem sido crescente (Rego *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 2016).

Porém, o estudo da feijoa tem sido dificultado por alguns fatores limitantes quer seja na conservação, produção, reprodução ou cultivo da espécie que impossibilitam o acompanhamento desta ao longo do ano.

Tal como referido anteriormente, a conservação e armazenamento do fruto por longos períodos de tempo é um dos fatores limitativos (Amarante & Santos, 2011). Decerto após a colheita, o tempo de conservação numa câmara refrigeradora a 4°C é de 20 dias. Além disso, estes apenas possuem dois dias de vida de prateleira a 20°C, o que compromete a sua qualidade. Nos processos de manuseamento do fruto tais como a apanha, manuseio, transporte, embalagem e armazenamento ocorrem frequentemente lesões no mesmo, o que pode levar ao escurecimento da polpa. Para a maioria dos frutos, o escurecimento dos tecidos acarreta uma redução da sua qualidade, devido à alteração de propriedades sensoriais e diminuição das propriedades nutricionais (Yoruk & Marshall, 2003).

O escurecimento da polpa em *A. sellowiana* é considerado um grande desafio no aspeto de conservação pós-colheita e comercialização dos frutos, pois este distúrbio ocorre mesmo em armazenamento refrigerado (Parra & Fischer, 2013; Amarante *et al.*, 2013)

No que diz respeito à reprodução e obtenção de plantas, a propagação através de mudas ainda demonstra ser um desafio devido à baixa qualidade das mudas e à reduzida eficiência do método, contrariando o uso de sementes uma vez que demonstra ser a forma mais procurada e eficaz. No entanto, neste método a rápida perda de viabilidade e vigor das sementes dificulta a sua conservação para estudos posteriores ao longo do ano (Gomes *et al.*, 2016). Porém, o armazenamento a 8°C revelou ser promissor na manutenção da viabilidade das sementes, apesar de afetar o vigor das plantas.

O facto de se utilizarem métodos de selecção artificial de características através de polinizações cruzadas controladas torna difícil a tarefa de obtenção e fixação de características desejáveis de interesse agronómico (Oltamari *et al.*, 2000).

Uma vez que os exemplares da espécie existentes ainda estão muito longe do desejado para comercialização e pela imensa diversidade genética que apresentam, o uso de técnicas de micropropagação, como a embriogénese somática, técnica para a obtenção de um número considerável de indivíduos, surge como uma forma de obter em massa genótipos superiores, além de servir como modelo para estudos fisiológicos, genéticos e bioquímicos do desenvolvimento embrionário em espécies superiores. (Canhoto & Cruz, 1996a; Zimmerman, 1993)

Mesmo com esse esforço de colheita, caracterização, conservação e melhoramento, ainda não foram encontradas plantas que reúnam todas as características desejáveis para o cultivo comercial, tornando-se não só um desafio, mas também uma oportunidade para a obtenção de combinações alélicas consideradas superiores em termos de uniformidade de tamanho de fruto, sabor, produtividade e adaptação ao cultivo na região sul do Brasil. Tanto para recomposição ambiental quanto para comercialização de produtos, a procura por sementes ou mudas de espécies florestais nativas vem sendo crescente (Donadio & Moro, 2004; Gomes *et al.*, 2016) com o objectivo de seleccionar genótipos superiores e desenvolver um sistema de produção que permita o seu cultivo em escala comercial.

1.2.6. Processos de melhoramento

A selecção de indivíduos de feijoa com vista ao aperfeiçoamento da espécie ainda está numa fase muito inicial. Contudo, já existem países a desenvolver trabalhos de melhoramento genético, envolvendo o estabelecimento de génotipos e posterior propagação vegetativa; polinização; hibridização e selecção para o cultivo da espécie como árvore frutífera.

De momento os métodos utilizados são tradicionais, como a propagação da espécie por semente, podendo também ser por estacaria e enxertia. Nestes dois últimos casos existem uma série de limitações tais como a baixa qualidade das mudas, a possibilidade de nem sempre haver resposta positiva por parte das plantas sujeitas a estes tratamentos bem como o facto da oxidação resultante nos tecidos condicionar negativamente a percentagem de enraizamento (Duarte *et al.*, 1992; Fachinello & Nachtigal, 1992).

Desta forma e como alternativa aos métodos convencionais surge a micropropagação. A selecção de indivíduos que assumam características desejáveis ainda é bastante incipiente sendo que, têm vindo a ser realizados vários estudos de conservação da diversidade fenotípica e genética da espécie. Estes estudos têm sido encaminhados principalmente por países onde a feijoa é cultivada com fins comerciais, como é exemplo a Colômbia e a Nova Zelândia, onde a espécie é exótica. Apesar das culturas de feijoa serem bastante resistentes ao frio e às geadas, estas apresentam sensibilidade e vulnerabilidade em relação aos parasitas como larvas de coleópteros, nemátodes e alguns fungos como *Botrytis cinerea*, *Phytophthora spp.* e *Pythium spp.* (Canhoto & Cruz, 1996b). Desta forma, nos processos de obtenção de indivíduos, à que ter em consideração a susceptibilidade da feijoa em zonas nativas a diversas pragas (Ducroquet *et al.*, 2000), sendo a mosca da fruta (*Anastrepha fraterculus*) e a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, as mais alarmantes. A antracnose provoca o tombamento de plântulas, a perda de mudas, a secagem de ramos e a morte das plantas adultas assim como, manchas escuras nos frutos com a parte central de coloração rósea podendo danificar até 100% de frutos jovens ou próximos da maturação (Andrade & Ducroquet, 1994; Ducroquet *et al.*, 2000). Os fatores acima referidos tornam-se extramente importantes quando se considera o cultivo (destes

indivíduos mais suscetíveis) em Portugal, uma vez que a entrada desta espécie no território nacional pode permitir a entrada também de pragas associadas.

1.3. Biologia reprodutiva das plantas-Embriogénese zigótica

A embriogénese zigótica resulta de um processo natural de reprodução sexuada originando descendência, garantindo a perpetuação da espécie. Deste modo, a variabilidade genética é garantida na meiose pelo *crossing-over* e pela disjunção dos alelos, assim como na fecundação através de polinização cruzada dos indivíduos. Tais acontecimentos favorecem a adaptação a diferentes ambientes garantindo a evolução da espécie. Relativamente ao cultivo da planta, este método acaba por não ser muito interessante uma vez que não preserva as características fenotípicas desejáveis dos progenitores. Da primeira divisão até à formação do embrião maduro, podemos considerar 4 fases morfológicas, sendo estas: fase **globular** (embrião com simetria radial, estrutura esférica e compacta de células com intensa actividade mitótica), **cordiforme** (embrião com simetria bilateral, com acumulação de auxinas na região apical que origina os cotilédones onde se irá desenvolver o meristema apical do caule; a região intermediária, e a região basal, originam o hipocótilo e a raiz respetivamente), **torpedo** (embrião com uma forma mais alongada, com os meristemas apicais completamente formados) e **cotiledonar** (embrião com todas as células preenchidas com grandes quantidades de substâncias de reserva; cotilédones completamente diferenciados) (Fig. 3). Fornecidas as condições necessárias, o embrião germina sofrendo várias transformações até se tornar numa planta (Fig. 4).

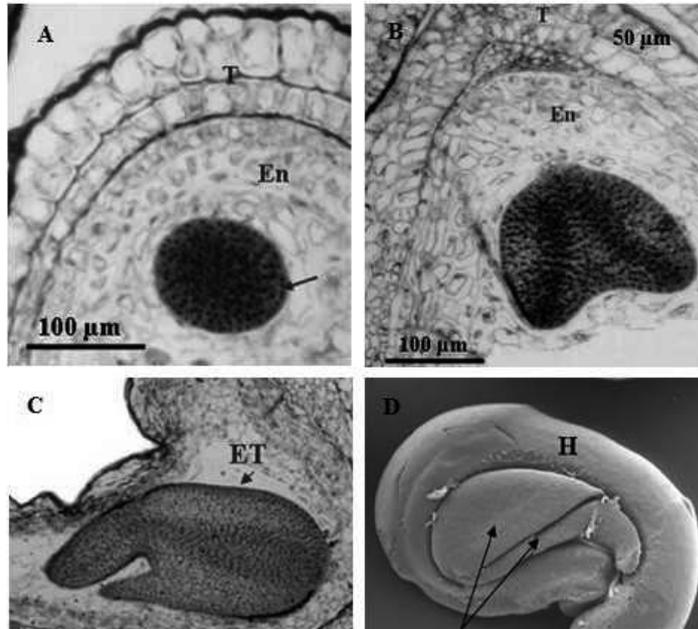


Figura 3. Diferentes fases de desenvolvimento de embriões zigóticos de *Acca sellowiana*. (A) Fase globular; (B) Fase cordiforme; (C) Fase torpedo; (D) Fase cotiledonar; (T) tegumento; (En) endosperma; (ET) embrião em fase torpedo; (Cot) cotilédones; (H) hipocótilo; (R) radícula. (Fonte: Pescador, 2004; Canhoto, 2009)

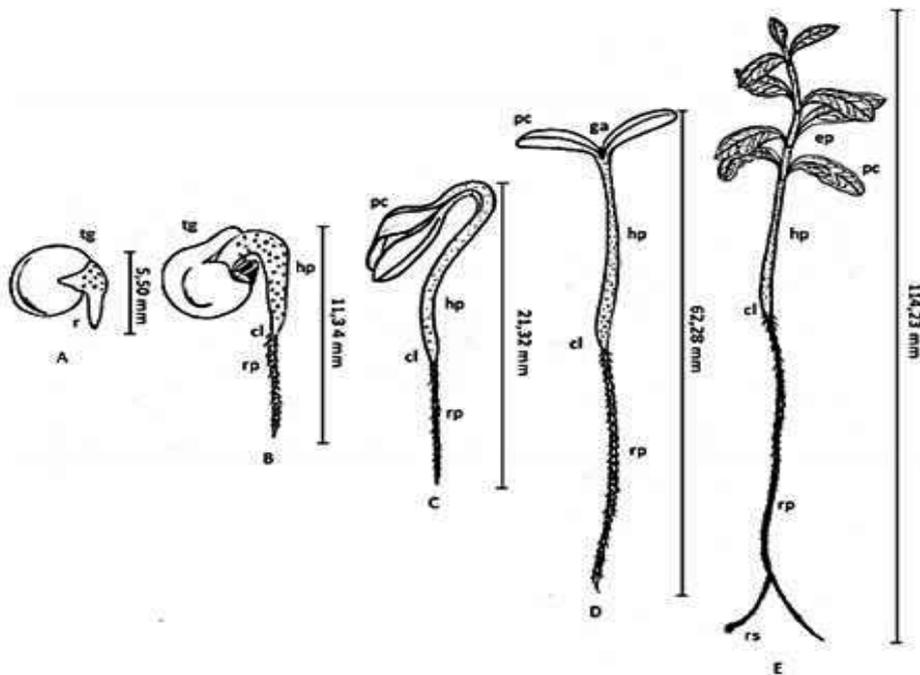


Figura 4. Fases da germinação e formação da plântula de *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret. (A) Início do desenvolvimento; (B) Diferenciação da raiz e do hipocótilo; (C) Aparecimento dos paracotilédones; (D) Plântula com paracotilédones expandidos; (E) Plântula desenvolvida. (tg: tegumento; r: radícula; hp: hipocótilo; cl: colo; rp: raiz primária; pc: paracotilédone; ga: gema apical; ef: eofilo; ep: epicótilo; rs: raiz secundária). Gomes et al., 2016

1.3.1. Micropropagação

Com a evolução da agricultura houve necessidade de aprimorar características mais apreciadas das espécies vegetais, seja por conferirem resistência a agentes patológicos, ou pelo tamanho/sabor do fruto, tamanho da flor (ornamental) entre outras. A micropropagação surge como uma necessidade de manter características de interesse, como uma forma de transmiti-las aos descendentes e como uma forma alternativa eficaz em relação aos métodos convencionais (Canhoto *et al.*, 2009). Esta técnica é ainda utilizada para a obtenção de plantas uniformes e em grande escala num período de tempo relativamente curto quando equiparado a outros métodos tradicionais. As plantas micropropagadas para além de apresentarem qualidade fitossanitária superior (Hartmann *et al.*, 1997), ainda apresentam maior uniformidade, vigor, crescimento e desenvolvimento mais rápidos, relativamente às plantas propagadas por semente.

Este processo veio revolucionar as técnicas até então utilizadas, com o mesmo propósito (técnicas de multiplicação vegetativa) como estacaria e enxertia, que apresentavam limitações como a falta de rejuvenescimento da planta, a dificuldade em estabelecer enxertias bem-sucedidas e o processo de enraizamento (Andreu e Marín, 2005; Litwinczuk *et al.*, 2005; Titon, 2003).

1.3.2. Técnicas de micropropagação

A micropropagação é um processo rápido de multiplicação de plantas que visa obter plantas geneticamente iguais às que lhe deram origem, sendo por isso um processo de clonagem.

Tal só é possível devido à capacidade das plantas de regenerar rebentos e novas plantas a partir de células ou tecidos somáticos. Dito isto, podemos definir três metodologias de micropropagação, a proliferação de meristemas (meristemas apicais do caule ou axilares), neoformação de gemas (organogénese) e produção de embriões somáticos (Chawla, 2009).

Devido ao rejuvenescimento das plantas micropropagadas, Andreu e Marin (2005) conseguiram verificar que explantes de porta-enxertos de *Prunus* 'Adesoto101' obtidos a partir de plantas micropropagadas apresentam maior capacidade de estabelecimento que explantes retirados de mudas obtidas por estacaria. Conseqüentemente as sucessivas repicagens do material vegetal *in vitro* levam a um elevado período de juvenildade após plantio em campo, apresentando-se como um inconveniente uso comercial (Schuch & Erig, 2005)

Os primeiros estudos em *A. sellowiana* foram realizados em 1987 por Bhojwani e colaboradores em que foram realizados, a partir da cultura de ápices, de segmentos nodais e de folhas imaturas das quais se obtiveram calos para proceder à indução de organogênese. Contudo os resultados obtidos não foram satisfatórios demonstrando baixas taxas de neoformação de gemas e altos índices de contaminação e oxidação.

Em 1990 Cruz e colaboradores conseguiram, pela primeira vez, induzir embriogênese somática em *Acca sellowiana* a partir de cotilédones de embriões zigóticos usando meio Murashige e Skoog (MS) suplementado com sacarose e um regulador de crescimento 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético). Em 1994 numa experiência conduzida no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade de Coimbra, por Canhoto e colaboradores, foi possível obter uma elevada produção de embriões somáticos resultantes da alteração dos teores de sacarose no meio de indução. Desde então, várias experiências usando esta espécie deram continuidade ao estudo. As experiências que se seguiram vieram otimizar o protocolo estabelecido até à data (Canhoto *et al.*, 1996b). Desta forma a embriogênese somática na feijoa tornou-se um importante modelo de estudo à investigação de dados morfológicos comparando-se à embriogênese zigótica. Paralelamente foram estudados outros tipos de micropropagação como a organogênese, segmentos nodais, cultura de meristemas, de anteras e de ápices caulinares (Canhoto, 1994; Canhoto & Cruz, 1996a), mostrando a baixa eficiência no potencial regenerativo. Apesar dos progressos desenvolvidos para melhoramento de protocolos e apresentação de métodos alternativos de indução de embriogênese somática, alguns fatores limitantes como a elevada taxa de embriões anómalos gerados e a baixa capacidade do tecido vegetal adulto sofrer embriogênese somática, persistem. Desde então, diversos estudos foram feitos com o intuito de melhorar o protocolo de ES (Canhoto & Cruz 1996a; Guerra *et al.*, 2001; Stefanello *et al.*, 2005), assim como perceber os processos histológicos e bioquímicos adjacentes ao desenvolvimento dos embriões somáticos (Cangahuala-Inocente *et al.*, 2004, 2007, 2009; Pescador *et al.*,

2008, 2012; Correia & Canhoto, 2010). No nosso laboratório seguiram-se estudos de caracterização de estruturas comuns na embriogénese como o suspensor (Correia, 2007) assim como estudos para avaliar os fatores envolvidos na embriogénese (Canhoto *et al.*, 1996b).

Comparando diferentes técnicas de micropropagação, a embriogénese somática é a que tem revelado maior sucesso, uma vez que permite obter um elevado número de embriões, não carece de enraizamento e permite clonar genótipos de interesse (Canhoto *et al.*, 1994; Stefanello *et al.*, 2005). No entanto esta metodologia ainda apresenta algumas limitações como a elevada taxa de embriões anómalos o que consequentemente condiciona a germinação e conversão numa planta (Canhoto *et al.*, 1996a; Pescador *et al.*, 2008). Estudos indicam que a elevada percentagem de formação de embriões anómalos pode estar relacionada com efeito residual da auxina 2,4-D, o que acaba por influenciar no normal funcionamento dos processos fisiológicos e genéticos (Pescador *et al.*, 2008).

1.3.3. Embriogénese somática em feijoa

A embriogénese somática consiste na obtenção de embriões funcionais a partir de células somáticas do explante utilizado, sejam estes embriões (imaturos ou maduros ou os seus constituintes) explantes de diferentes órgãos da planta, protoplastos ou células em suspensão, sem que seja necessário ocorrer fecundação. Embora seja algo polémica a designação que deve ser atribuída aos embriões formados a partir de células somáticas, tais como embriões adventícios, supranumerários ou acessórios, a terminologia mais vulgarmente conhecida é a de “embriões somáticos” (Canhoto *et al.*, 2009). Dessa forma o DNA da(s) célula(s) que deram início à embriogénese somática é mantido. Essa capacidade de retorno à totipotência e posterior formação de embriões normais, é uma característica exclusiva do reino vegetal (Zimmerman, 1993), que só é bem-sucedida sob condições específicas (Figueroa *et al.*, 2006). Desta forma, a embriogénese somática constitui uma excelente ferramenta para estudos moleculares, citológicos, fisiológicos e para modelos de desenvolvimento vegetal (Feher *et al.*, 2005; Figueiroa *et al.*, 2006). No entanto ainda residem questões bastante importantes quanto aos mecanismos que estão relacionados com a mudança da transição de células

diferenciadas numa planta em células totipotentes que geram estados embrionários (Fehér *et. al.*, 2005).

Através de estudos comparativos a diversos níveis foi possível descrever diferentes estágios na embriogénese somática: indução, desenvolvimento, maturação e conversão de embriões somáticos a plantas (germinação) (Dodeman, 1997).

A embriogénese somática pode ser considerada de duas formas: direta a partir de um explante ou indireta dependendo da existência de um primeiro estágio com formação de calo ou de suspensões celulares, podendo a origem ser uni ou pluricelular (Sharp, 1980). Merkle e colaboradores (1995) descreveram dois processos de embriogénese somática, “two-step”, em que existem dois processos de cultura. No primeiro, o explante é colocado num meio com um agente indutor (auxina e/ou citocinina) passando para um segundo meio isento de reguladores de crescimento; ou apenas um “one step” em que o explante é mantido em contacto permanente com o meio com reguladores de crescimento até ao desenvolvimento de embriões, sem que haja transferência para um outro meio.

A indução da embriogénese somática está dependente de fatores como o genótipo do explante, meio de cultura, reguladores de crescimento e condições de cultivo que influenciam a sua competência (Yeung, 1995; Guerra *et al.*, 2001). Em condições adequadas de indução dá-se o desenvolvimento, em que os explantes originam embriões somáticos que passam pelas mesmas fases de desenvolvimento dos zigóticos (Umehara & Kamada, 2005; Jiménez, 2005). Na feijoa embriões zigóticos maduros e embriões somáticos surgem direta ou indiretamente na zona cotiledonar no lado adaxial. Para que haja maturação dos embriões desenvolvidos é necessário que haja uma diminuição da concentração de auxinas no meio ou até mesmo ausência. Na *A. sellowiana*, a germinação e conversão de embriões em plantas apresenta-se como um processo crítico uma vez que as taxas são muito reduzidas.

Apesar da micropropagação ser uma tecnologia bastante importante na multiplicação de plantas lenhosas, revela algumas limitações, tais como: ser um processo muito moroso, em determinados casos, e que requerer um forte investimento laboratorial, encarecendo o produto comparativamente às plantas produzidas por métodos convencionais de propagação. Tendo isto em conta, poderão ser adotadas algumas medidas como a aplicação destes métodos a plantas de valor acrescentado, a otimização de sistemas mais eficientes assim como a robotização do processo tornando o mais económico (Kane, 2005).

1.3.4. Embriogénese zigótica e somática

Os embriões somáticos assemelham-se aos zigóticos, passando pelas mesmas fases de desenvolvimento morfológico, tendo a capacidade de por germinação formar uma planta (Marques, 2002; Canhoto *et al.*,2009).

No entanto, existem algumas diferenças no desenvolvimento entre embriogénese somática e embriogénese zigótica para além do espaço físico onde se desenvolvem. Os embriões somáticos estão mais expostos a condições de stress, armazenam menos substâncias de reserva e não passam por uma fase de maturação que inclua dormência, logo têm a capacidade de germinar precocemente relativamente aos embriões zigóticos. Na embriogénese somática poderá ocorrer variação somaclonal devido a metilações do DNA, rearranjos dos cromossomas e mutações pontuais causados sobretudo na resposta ao stress imposto na planta pelas condições *in kumar*

Nos embriões zigóticos as primeiras divisões do zigoto seguem um padrão bem definido e que é característico da espécie. No entanto, nos embriões somáticos essa mesma divisão inicial dentro de uma mesma espécie ocorre de forma ocasional (Canhoto *et al.*,2009).

1.3.5. Indução de embriogénese através de situações de stress

A utilização de mecanismos que possam causar stress com o propósito de induzir a embriogénese constitui um método alternativo de indução de embriogénese somática com a vantagem de diminuir o tempo de exposição a reguladores de crescimento, como é o caso de 2,4-D. Deste modo evita-se os efeitos secundários que possam estar relacionados como por exemplo a formação de embriões anómalos (Canhoto& Cruz,1996a) resultantes da exposição contínua do explante á hormona.

1.3.6. AGP (proteínas de arabinogalactano)

As AGP's são classificadas como glicoproteínas e a sua constituição é composta amplamente por resíduos de arabinose e galactose (90-98% p/p). Estes estão associados a uma proteína (Fig.5). As AGP's estão presentes em todo o Reino vegetal estão presentes em vários órgãos das plantas, incluindo raízes, caules, folhas, flores e sementes (Showalter, 2001). Ao nível celular estes encontram-se na membrana, na parede, nos espaços intercelulares (Nothnagel, 1997) e intracelulares, em corpos multivesiculares (Herman & Lamb, 1992; Roy *et al.*, 1998).

A sua presença foi também identificada por Kreuger *et al.* (1993) num meio de cultura contendo células embriogénicas e demonstraram serem essenciais ao desenvolvimento de embriões somáticos. Van Hengel e colaboradores (2002) verificaram que a actividade biológica do AGP na formação de embriões somáticos altera-se dependendo da idade das sementes.

O seu desempenho ainda não está completamente esclarecido, no entanto existem indícios de que possam estar envolvidas nos processos de proliferação de células, reprodução diferenciada do xilema, respostas a stresses abióticos, morte celular programada e marcação celular, progressão da divisão celular e indução da embriogénese somática (Majewska-Sawka & Nothnagel, 2000; Gao & Showalter, 2000; Kreuger & Van Holst, 1993).

Estudos comparativos revelam que a combinação de AGP proveniente de goma arábica e ovários de trigo ao meio de cultura aumentam não só a viabilidade dos micrósporos como também a qualidade e quantidade de embriões que se desenvolvem em plantas quando comparadas ao meio só contendo ovário. (Letarte *et al.*, 2006b).

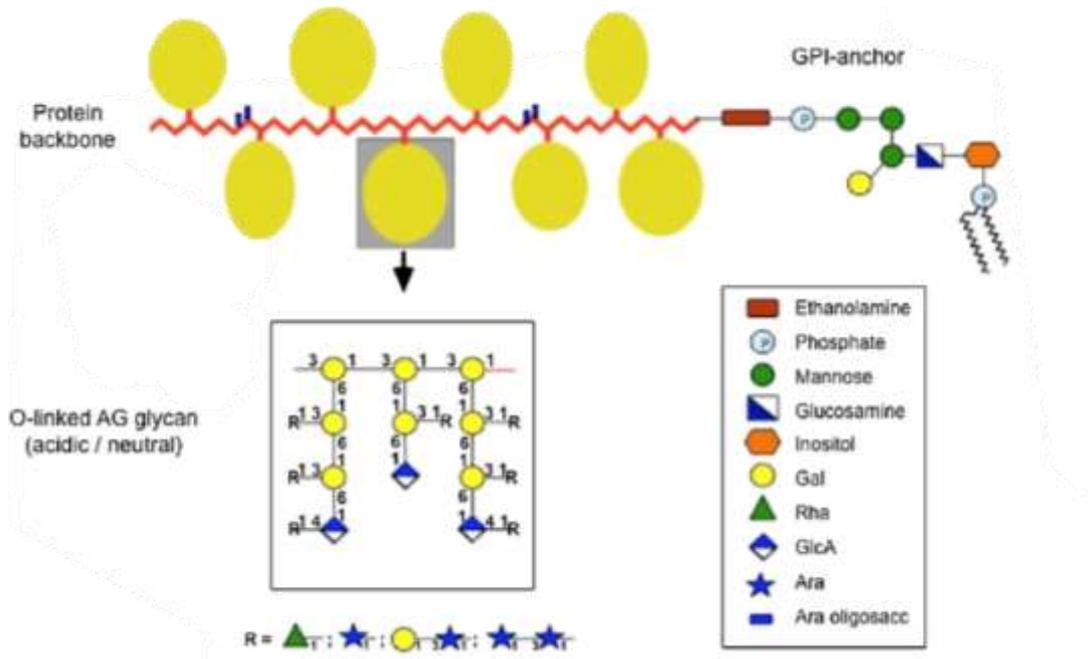


Figura 5. Representação esquemática do modelo de estrutura de AGP's "the wattle blossom" com a âncora membranar GPI anexa (retirado de Ellis *et al.*, 2010).

1.4. Objectivos

Em 1994, numa experiência conduzida no laboratório de biotecnologia vegetal da universidade de Coimbra, Canhoto e colaboradores conseguiram obter uma elevada produção de embriões somáticos resultantes da alteração dos teores de sacarose no meio de indução. Desde então diversos estudos relacionados com a espécie têm vindo a ser desenvolvidos como já referido anteriormente. No entanto a embriogénese somática na feijoa ainda apresenta algumas limitações no processo de obtenção de plântulas a partir de embriões somáticos.

Indo de encontro a trabalhos já desenvolvidos, a presente dissertação visa: 1) estabelecimento de famílias de genótipos, de forma a fixar características de interesse tais como o tamanho do fruto e a qualidade organoléptica; 2) implementação de métodos alternativos à embriogénese convencional através da realização de ensaios de choque auxínico e da indução da embriogénese com utilização da AGP; 3) análise da maturação de embriões somáticos com o objectivo de verificar a competência da embriogénese, ou seja, visando a optimização da produção de plantas assim como a fixação de características de interesse.

2. MATERIAL E METODOS



2.1. Material vegetal

O material vegetal utilizado na realização dos ensaios deste trabalho é proveniente de árvores adultas de diferentes zonas do País como: Aveiro (A), Vale de Cambra (VC) e Coimbra (árvores do Jardim Botânico (B) e do jardim da casa de um particular (PJC) (

Figura 6). Foram utilizadas diferentes partes da planta dependendo do que se pretendia estudar. As sementes dos frutos maduros foram utilizadas no estudo da germinação e da embriogénese somática



Figura 6 Mapa de Portugal Continental com ampliação dos distritos de Aveiro e Coimbra onde foram recolhidos os frutos de feijoa.

2.1.1. Preparação do material vegetal

Nesta etapa foram utilizadas sementes provenientes de frutos maduros de 3 regiões (Aveiro, Vale de Cambra e Jardim Botânico de Coimbra). Os frutos foram lavados em água corrente, seguidamente fez-se a extração da polpa para papel de filtro. Esta foi posteriormente lavada em água corrente de forma a conseguir remover o grosso da matéria. A matéria resultante das lavagens foi dispersa sobre papel de filtro, deixando as sementes ao descoberto. De seguida procedeu-se à secagem das sementes ao natural. Depois de secas estas foram isoladas e assim que necessário, esterilizadas.

2.1.2. Esterilização das sementes

A esterilização das sementes realizou-se segundo dois passos. No primeiro, as sementes foram lavadas em água destilada com uma gota de *tween* 20 por cada 100 ml de água, durante 10 minutos. Posteriormente efetuou-se uma primeira esterilização, imergiram-se as sementes numa solução de etanol a 70% durante 2 minutos. Após algum tempo, lavaram-se as sementes com água destilada e colocaram-se durante 15 minutos numa solução de hipoclorito de cálcio a 6% (p/v). Na preparação da solução mencionada anteriormente, o hipoclorito de cálcio sólido foi diluído em água destilada e filtrada a solução. Posteriormente as sementes foram lavadas com água destilada esterilizada na câmara de fluxo laminar previamente preparada, em condições assépticas. Num segundo passo as sementes foram colocadas numa caixa de Petri (10 cm de diâmetro) devidamente selada com película aderente, onde permaneceram embebidas em 15 ml água destilada esterilizada durante 48h, na câmara de escuro a 26°C. Decorridas as 48h efetuou-se uma nova esterilização com hipoclorito a 6% durante mais 10 minutos e repetiu-se o processo das lavagens.

2.1.3. Meio de cultura

Os meios de cultura utilizados, foram constituídos pelo meio de cultura base MS (Murashige & Skoog 1962), cuja composição está representada na **Tabela 1**, ao qual foi adicionado diferentes combinações de sacarose e um regulador de crescimento (PGR).

O meio MS foi preparado a partir de soluções stock concentradas: macronutriente, micronutrientes, Fe-EDTA, mio-inositol, vitaminas e outros compostos orgânicos, a sacarose foi pesada e adicionada no momento da preparação dos meios. O pH do meio foi ajustado para valores entre 5,7 e 5,8, utilizando-se soluções 0,1-1,0N de KOH e/ou HCl. Posteriormente adicionou-se agar na concentração de 0,6% (p/v). Após a dissolução do agar, por aquecimento, o meio foi distribuído por tubos de ensaio numa quantidade aproximada de 10 ml/tubo. Os tubos foram rolhados com algodão cardado envolto em gaze e seguidamente autoclavados a uma temperatura de 121°C e a uma pressão de 1 atmosfera, durante 20 minutos.

Tabela 1. Constituição do meio Murashige & Skoog (1962).

Macronutrientes (g/l)		Micronutrientes (mg/l)		Fe-EDTA (mg/l)		Compostos orgânicos (mg/l)	
KNO ₃	1,9	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,80	Mio-inositol	100
NH ₄ NO ₃	1,65	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	Na-EDTA	37,30	Ácido Nicotínico	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,37	H ₃ BO ₃	6,2			Tiamina-HCl	0,1
KH ₂ PO ₄	0,17	KI	0,83			Piridoxina -HCl	0,5
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,44	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,02 5			Glicina	2
		Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25				
		CoCl ₂ .6H ₂ O	0,02 5				

Tabela 2.Constituição do meio de cultura dos diferentes métodos.

Método	Meio de cultura	Sacarose (g/L)	PGR (mg/L)	
<u>Germinação</u>	1/2MS	20	0	
<u>Estabelecimento</u>	MS	30	$\frac{\text{BAP}}{1}$	
<u>Micropropagação</u>	MS	30	$\frac{\text{Zeatina}}{0,5}$	
Embriogénese				
"two step"				
ID		2,4-D		
tempo (dias) [1-20 [MS	90	1
[20-40[ED1	MS	10	0,1
	ED2		45	0,2
	ED3		90	0,2
	ED4		45	1
	ED5		90	1
[40-75]	ED1	MS	10	0,1
	ED2		45	0,2
	ED3		90	0,2
	ED4		45	1
	ED5		90	1
t (dias) [1-35[MS	90	1
[35-75] dias	ED1	MS	10	0,1
	ED2		45	0,2
	ED3		90	0,2
	ED4		45	1
	ED5		90	1
"one step"				
Contínua	MS	90	1	
Choque auxínico				
Indução		MS	0	IBA
CAIBA				100
CA2,4-D		MS	0	$\frac{2,4-D}{100}$
Maturação	MS	20	0	
Choque auxínico IBA				

ID	IBA		
CA1	MS	0	100
CA2	MS	0	250
Maturação	MS	20	0

AGP	<u>[mg/L]</u>		
AGP1	MS	30	1
AGP2	MS	30	2
AGP4	MS	30	4
AGP8	MS	30	8

2.2. Germinação

Após a esterilização procedeu-se à indução da germinação das sementes sob duas condições distintas. Num dos “processos” foram distribuídas 10 sementes por cada caixa de Pétri com papel de filtro e algodão previamente humedecido e no outro foram colocadas duas sementes por cada tubo de ensaio contendo meio MS (Murashige & Skoog, 1962) a 2% (p/v) de sacarose.

Seguidamente foram acondicionadas numa câmara escura a 26°C durante 10 dias. Caso se verificasse a germinação, seriam posteriormente transferidas para uma câmara a 25°C, com um fotoperíodo de 14h.

2.2.1. Viabilidade de sementes

A viabilidade das sementes foi testada e calculada através de métodos estatísticos. Para tal, foram consideradas não viáveis as sementes que foram incapazes de germinar ou apresentavam mal formação. Das plantas viáveis geradas, parte foram transferidas para um substrato esterilizado composto por areia e perlite (2:1 v/v) cobertos por plástico nas primeiras semanas, onde foram mantidas na câmara de cultura (Fitoclima 1000 EHHF) a 20°C, 70% humidade e fotoperíodo de 12 horas. Outras foram tratadas na câmara de fluxo, onde se removeram as raízes e as partes aéreas das plantas foram colocadas em recipientes de vidro que continham 25 ml de meio MS suplementado com

3% (p/v) de sacarose e 1mg/L de BAP para serem micropropagadas (Fig.7). Uma vez que os recipientes acima mencionados apresentam uma elevada taxa de contaminação, implicando uma elevada perda de material vegetal optou-se pela utilização de caixas de cultura de forma a minimizar estas perdas.

Em ensaios preliminares verificou-se que a hormona BAP a 1mg/l induzia bastante a produção de calo e pouco desenvolvimento nas plantas micropropagadas, optando-se pela utilização da Zeatina (0,5mg/L) nos ensaios seguintes.

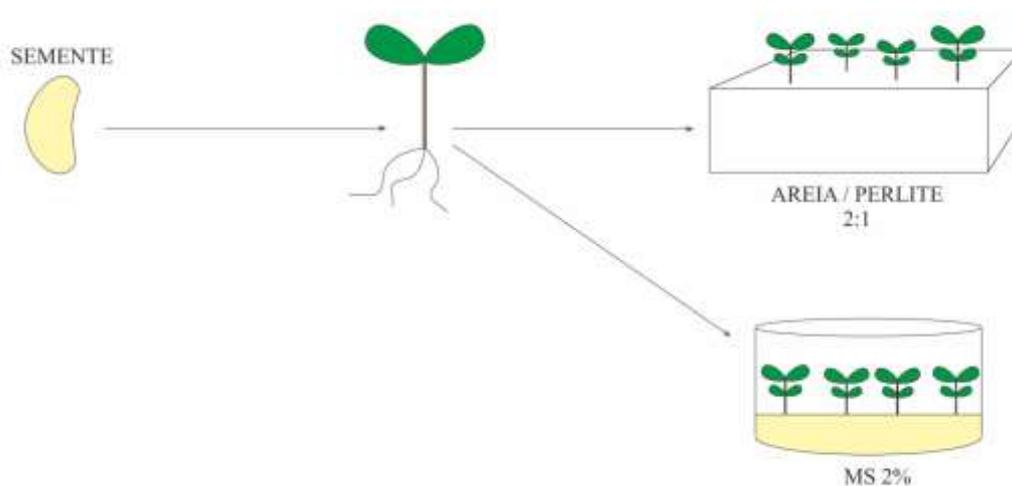


Figura 7 Esquema representativo do processo de germinação.

2.3. Estabelecimento

No estabelecimento foram utilizados entrenós e meristemas apicais e axilares provenientes de ramos de plantas de Aveiro (A) e Coimbra (PJC), Para isso procedeu-se à remoção das folhas ficando os ramos “nus” (**Figura 8**). Foi feita a lavagem dos mesmos em água corrente e *tween* 20 e posteriormente colocados num vaso com água destilada esterilizada, na câmara de cultura (Fitoclima 1000 EHHF) a 20°C, 70% humidade e fotoperíodo de 12 horas. Seguidamente foram borrifados com uma solução de BAP (1mg/l) de forma a promover o abrolhamento (Fig.8). Assim que os rebentos atingiam aproximadamente 1,5 cm foram extraídos para estabelecimento. Após a

recolha dos rebentos, foram lavados em água destilada com *tween* 20 (1 gota/100ml de dH₂O) e posteriormente imergidos em etanol 70% durante 30 segundos, lavados com dH₂O e esterilizados em hipoclorito de cálcio a 6 %.

Na câmara de fluxo laminar previamente esterilizada, procedeu-se a três lavagens consecutivas dos explantes sendo estes colocados posteriormente em PVP 0,02% (p/v). As folhas mais desenvolvidas dos meristemas apicais foram removidas expondo o meristema propriamente dito, que viria a ser colocado em meio de cultura. Os raminhos foram segmentados e o entrenó cultivado.

Foram anotados os resultados, e tratados posteriormente sob métodos estatísticos.

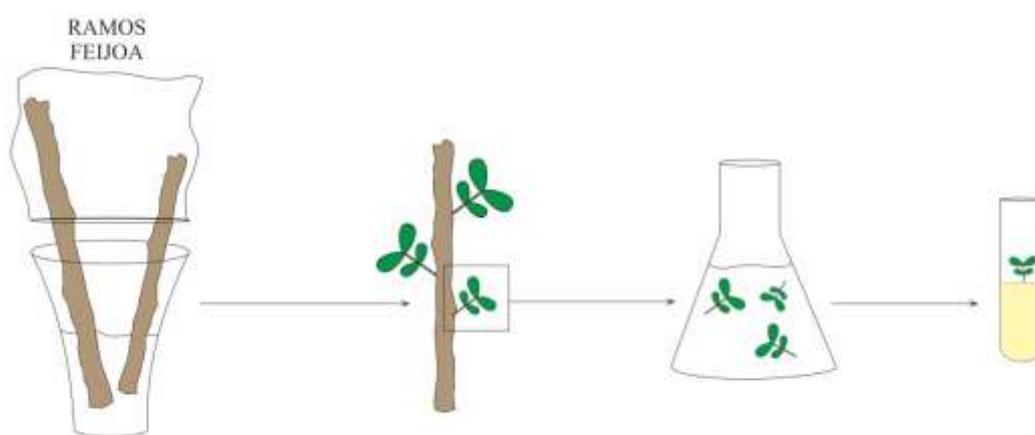


Figura 8 Representação do processo de estabelecimento *in vitro*.

2.4. Embriogénese

Na embriogénese foram utilizadas sementes de frutos maduros (Fig.9 (A e B)) provenientes de duas famílias de genótipos: Aveiro (A) e Coimbra (PJC). Os embriões zigóticos da feijoa foram cuidadosamente removidos das sementes (Fig.9 (C e D)) 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 (Fig.9 (E)) com os cotilédones completamente desenvolvidos. Para a avaliação da eficácia da formação e desenvolvimento de embriões somáticos, utilizaram-se os dois

processos de embriogênese “one step” e “two step”. Os dois processos foram comparados o que permitiu avaliar as respostas dos embriões à variação do teor de sacarose e hormona (2,4-D).

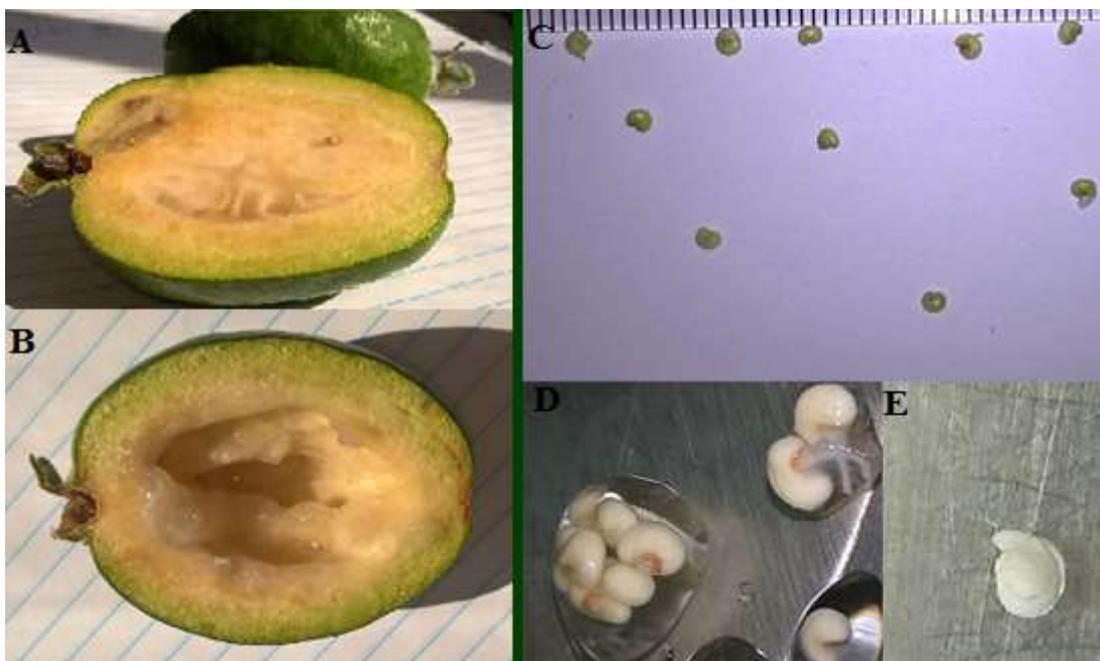


Figura 9 Ensaio de embriogênese. A-corte longitudinal do fruto, B- fruto sem sementes, C- sementes de feijoa após serem extraídas (genótipo PJC), D- sementes de feijoa após esterilização (genótipo A), E-embrião de feijoa.

2.4.1. Embriogênese “one-step” e “two-step”

Após a extração dos embriões zigóticos de feijoa, estes foram inoculados inteiros em tubos de ensaio (1 embrião/tubo). Verificou-se maior facilidade na obtenção de embriões perfeitos e sem contaminação utilizando uma dupla esterilização com embebição das sementes durante 48h, procedendo-se dessa forma.

Foram comparados dois métodos de indução da embriogênese: o método convencional (EC) que consiste num processo de duas fases: colocação de embriões num meio de cultura embriogénico durante um período de tempo aproximado de 75 dias e posterior maturação dos embriões; com um método que consistiu na manutenção dos embriões no meio de cultura convencional e a dada altura fazer a transferência do calo

embriogénico para um meio de cultura selecionado. Primeiramente foram comparados dois períodos de transferência de embriões, 20 e 35 dias. Posteriormente para o genótipo A foi adotado o período de transferência ao 35º dia uma vez que os resultados preliminares para t=20 não foram satisfatórios. Ao 75º dia de embriogénese foi avaliado o desenvolvimento dos embriões tendo em conta a alteração da concentração da fonte de carbono e a concentração da hormona que havia sido feita ao 35º dia. Deste modo foram considerados consoante o método as seguintes nomenclaturas: EC (embriogénese contínua ou “one step”) que funcionou como controlo ED (embriogénese “two step”) (Fig.10).

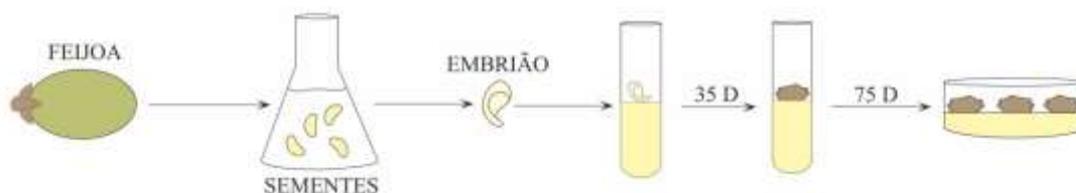


Figura 10 Esquema de indução de embriogénese somática e maturação dos embriões.

Meio de cultura

O meio de cultura utilizado para os 35 dias iniciais foi o MS agarizado 0,6% (p/v) suplementado com sacarose 9% (p/v) e 1mg/L de 2,4-D. Perfazendo esse tempo, 4 grupos compostos por 15 calos desenvolvidos, foram transferidos (1 calo/tubo) para cada um dos meios de cultura descritos na Tabela 2, representados por mais 40 dias. Em todos os meios de cultura o pH foi ajustado para valores entre 5,7 e 5,8 antes da autoclavagem.

2.4.2. Maturação dos embriões

Após 75 dias de embriogénese os embriões foram colocados no meio MS suplementado com sacarose 2% (p/v), durante 30 dias, para que ocorresse maturação dos embriões em estados primordiais. Mantiveram-se em condições com ausência de luminosidade e posteriormente foram colocados numa câmara com um fotoperíodo de 16h. Os resultados foram registados após 3 meses da transferência dos embriões para a camara de cultura.

2.4.3. Choque auxínico

O choque auxínico constitui uma alternativa à embriogénese com exposição prolongada a uma auxina. Deste modo, consequências que estejam associadas a este fenómeno são minimizadas, sendo como exemplos, a elevada formação de embriões anómalos e a diversidade de embriões em diferentes fases. O choque auxínico surge como uma via de otimização de embriogénese somática, sendo que neste ensaio a avaliação do choque auxínico foi feita em duas fases: a primeira em que foi feita a comparação da ação de duas auxinas à mesma concentração em diferentes tempos de exposição no embrião e a segunda fase em que foi analisado o desempenho dos embriões na indução de embriogénese, utilizando diferentes concentrações de IBA em diferentes tempos de exposição.

As soluções utilizadas para o choque auxínico foram constituídas por meio de cultura MS e 2,4-D ou IBA obtidos a partir de soluções stock à concentração de 500mg/L. Na primeira fase utilizou-se IBA e 2,4-D [100mg/L] sob diferentes tempos de exposição direta à hormona (5, 10, 20, 40 horas). Os embriões foram isolados conforme referido anteriormente e inoculados numa solução contendo meio MS com altas concentrações de hormona. Após o choque os embriões foram passados para um meio MS contendo 2% (p/v) de sacarose (Fig.11) onde permaneceram durante 90 dias.



Figura 11. Representação esquemática da indução de embriogênese através de choque auxínico.

No segundo ensaio com choques auxínicos, a auxina utilizada no estudo foi o IBA, e considerou-se a exposição à hormona para $t=1,2,4,8,16$ (t em horas), para as diferentes concentrações de auxina (100 e 250mg/l). Para este método utilizou-se uma caixa *multiwell* de 48 poços, em que os embriões depois de isolados foram imersos na solução de auxina (20 embriões foram inoculados em 2ml solução de auxina/poço). Assim que o tempo correspondente terminou, os embriões foram lavados três vezes, com auxílio de uma micropipeta, com água destilada esterilizada. Terminado o processo de lavagem, os embriões foram transferidos para caixas de cultura contendo 75ml de meio MS a 2% (p/v) de sacarose e acondicionados na câmara de escuro a 26°C. Foi feito o levantamento do ensaio após três meses do início das culturas.

2.4.4. Embriogênese através de AGP

Neste ensaio foram utilizadas sementes da família de genótipos de Aveiro. Os embriões foram cuidadosamente removidos na câmara de fluxo laminar e colocados em caixas de Petri de 5 cm de diâmetro que continham 10 ml de meio de cultura.

Ao meio de cultura MS com 3% (p/v) de sacarose duas vezes concentrado, foi adicionado um determinado volume da solução de AGP e foi feito o restante volume com água destilada esterilizada, para obter uma concentração nos meios de cultura que variava entre 1-8 mg/l (Tabela 2). Os embriões foram mantidos em contacto com o meio durante 75 dias e os dados foram registados para posterior tratamento estatístico.

2.4.5. Estudos morfológicos e histológicos

Na análise histológica foram utilizados embriões gerados a partir do método de embriogênese somática “two-step” 35 dias. Os embriões somáticos foram fixados em gluteraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, ao qual foi adicionado cloreto de cálcio 0,01 M, pH 7,2 durante 3 horas à temperatura ambiente. O material vegetal foi submetido a três lavagens de 15 min cada, no mesmo tampão, seguindo-se uma pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio, durante 2 horas. Após 3 lavagens de 15 min cada em água destilada, o material foi desidratado utilizando etanol pela respectiva ordem crescente (70, 80, 90, 95 e 100%). O material foi impregnado com três soluções sucessivas constituídas por etanol 100% e resina (Spurr, 1969) nas proporções 2:1, 1:1 e 1:2, durante 2 horas cada. Por fim o material foi mantido em resina pura por uma noite e de seguida colocado em moldes, tendo permanecido em estufa a 70°C durante 24 horas. Com os blocos resultantes do processo anterior, foram feitos cortes semi-finos (1-2 μ m) com facas de vidro no micrómetro Ultrotome Nova. Os cortes foram colocados numa gota de água destilada sobre uma lâmina de vidro e deixados a secar na estufa. Posteriormente foram corados com uma solução de azul de toluidina 1% durante 15 minutos na ausência de luz, à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas com água destilada para retirar o excesso de corante e colocadas na estufa. Os cortes foram observados e fotografados no microscópio Leica DM 4000 B usando o programa LAS v4.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO



3.1.1. Germinação e viabilidade das sementes

A germinação iniciou-se a partir do 4-5 dia de cultura das sementes, independentemente do genótipo da planta, sendo que, parte das plantas seguiram para o processo de micropropagação (Fig. 12) e as restantes para se desenvolverem até o estado adulto. As sementes só foram consideradas “germinadas” quando estas apresentavam desenvolvimento radicular inicial. Não se constatou qualquer diferença na germinação quando usadas placas de Petri com papel de filtro humedecido ou meio MS, o que vai ao encontro do estudo realizado por Gomes e colaboradores (2013) em que verificaram não haver diferenças significativas, na germinação de sementes a 25°C, entre diferentes substratos (papel e areia). No entanto, sementes germinadas em tubos de ensaio originaram plantas mais alongadas e com a raiz mais desenvolvida comparativamente a plantas germinadas em caixas de Petri, algo que pode estar relacionado com o espaço físico disponível para o desenvolvimento da planta. O facto das plantas germinadas em caixas de Petri apresentarem menor desenvolvimento/alongamento que as plantas desenvolvidas em tubos de ensaio poderá ter condicionado a sua adaptação a um novo substrato. Na germinação não se verificou diferenças significativas que pudessem estar associadas ao genótipo. Todas as famílias de genótipos tiveram mais de 90% das sementes germinadas (Fig. 13). No entanto, a família de genótipo que apresentou uma maior dificuldade de desenvolvimento na germinação foi a PJC (91,3%) seguindo-se as sementes retiradas de frutos da árvore localizada no Jardim Botânico de Coimbra (Fig. 13). As sementes que mais se destacaram quanto à elevada taxa de germinação foram as provenientes de Vale de Cambra (98,4%) assim como as de Aveiro (98,3%), como é possível verificar no gráfico da Fig. 13. As sementes de Vale de Cambra destacaram-se não só pela capacidade de germinação como também pela elevada percentagem de sobrevivência à passagem para o novo substrato (perlite). A capacidade de adaptação a novas condições de cultura não demonstrou estar relacionada com a facilidade de germinação ou com a dependência da família de genótipo, fazendo-se como exemplo, a família de genótipo PJC que embora tenha apresentado uma menor percentagem de germinação, revelou bastante adaptabilidade, obtendo a segunda melhor percentagem de sobrevivência de plantas, no processo crítico de aclimatização das plantas (Fig. 13). Deste modo é possível perceber

que algumas plantas apresentam maior resistência à mudança de substrato e ambiente que outras, devido à pequena variância que existe pela perda de exemplares aquando da alteração.

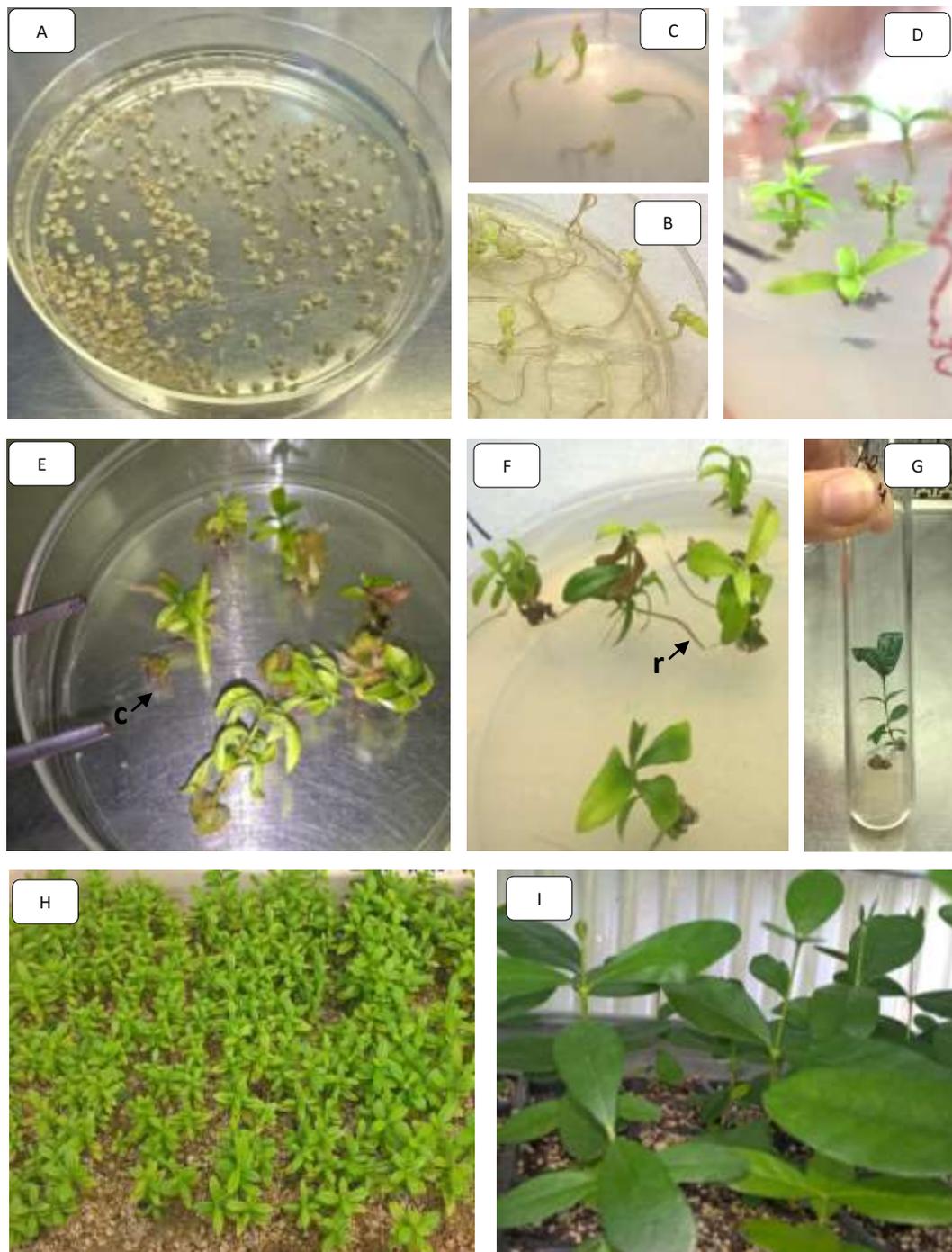


Figura 12 Processo de micropropagação da feijoa. (A) Sementes esterilizadas; (B) germinação das sementes; (C) Parte aérea; (D) Desenvolvimento meristemático; (E) Repicagem das plântulas; (F) Desenvolvimento de raízes *in vitro*; (G) Plântula em meio MS; (H) Plantas em substrato de perlite + areia; (I) Plantas em substrato de turfa + perlite + areia; c – calo; r – raíz.

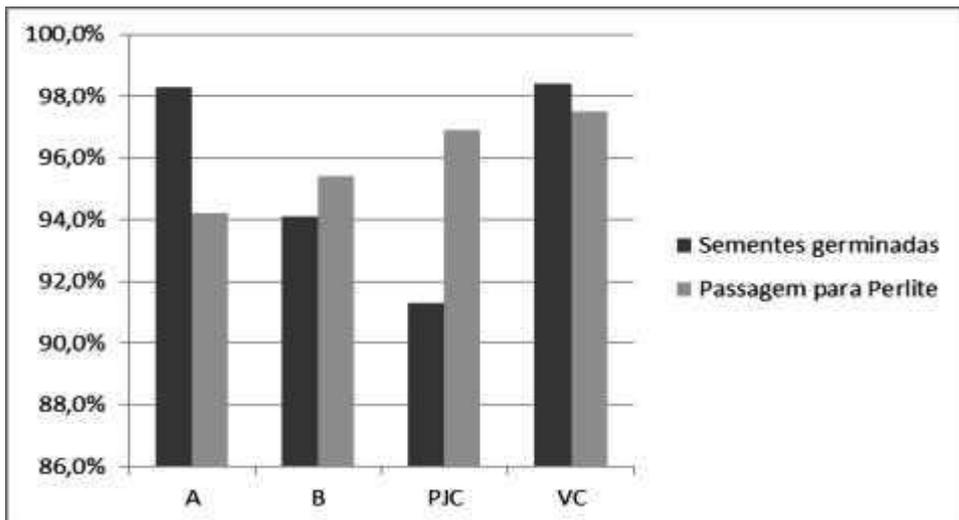


Figura 13 Percentagem de germinação dos diferentes genótipos em estudo e do número de plantas sobreviventes à passagem para substrato. (A) Aveiro; (B) Jardim Botânico de Coimbra; (PJC) Jardim de particular em Coimbra; (VC) Vale de Cambra.

Na passagem das plantas para substrato foram testadas as famílias de genótipo A e B, a fim de estudar a taxa de sobrevivência das mesmas. As plantas pertencentes ao genótipo A revelaram uma melhor adaptação ao substrato, contando com 77% de plantas sobreviventes, enquanto as plantas de genótipos B obtiveram uma adaptação ligeiramente mais baixa (74%) (Fig. 14). Em ambos os casos, as plantas apresentavam raízes secundárias bem desenvolvidas e uma parte aérea constituída por quatro pares de folhas, embora a diferença de tamanho entre as plantas não se mostrou ser significativa.

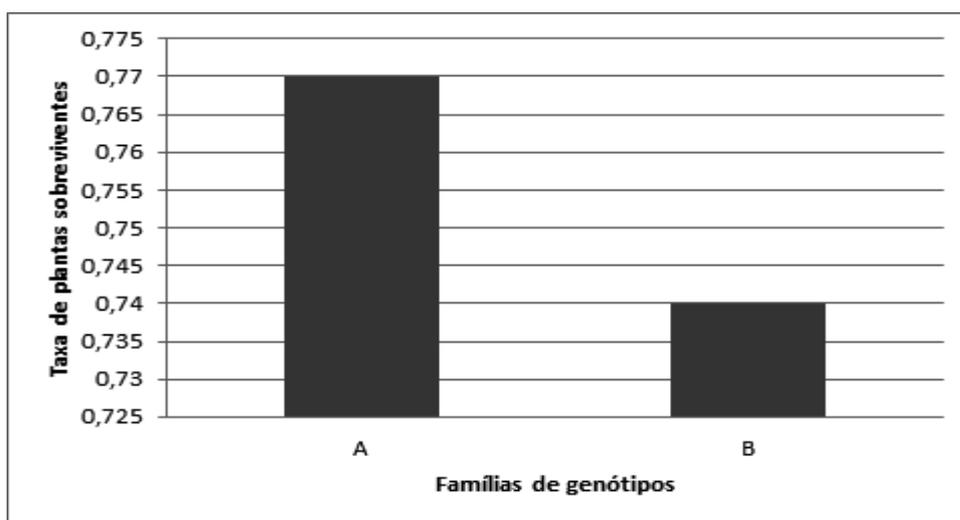


Figura 14 Taxa de plantas sobreviventes nas famílias analisadas. (A) Aveiro; (B) Jardim Botânico de Coimbra.

A micropropagação desenvolveu-se a partir de partes aéreas (*shoot*) das plantas germinadas. Estas foram inicialmente colocadas em recipientes de vidro, no entanto, devido às elevadas taxas de contaminação do meio, optou-se pela utilização de caixas de cultura de forma a contrariar esses resultados. Testes preliminares revelaram que o BAP a 1mg/l induzia a formação de calo na base do explante. Desta forma, optou-se -se pela utilização da Zeatina, uma vez que esta não induz a formação de calo e promove o enraizamento das plântulas em cultura *in vitro* (Fig. 12).

Na micropropagação, constatou-se que o desenvolvimento das plantas é dependente do genótipo. De uma maneira geral as plantas após dois meses em meio de cultura desenvolveram no mínimo dois entrenós (VC), de valor médio e no máximo 4 no caso das plantas do genótipo A, como é possível observar através do gráfico da Figura 15.

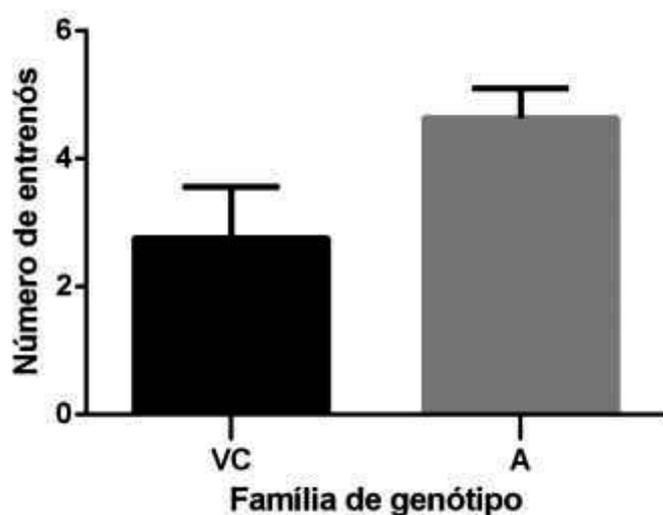


Figura 15: Micropropagação de meristemas nas famílias em estudo. (A) Aveiro; (VC) Vale de Cambra.

3.2. Estabelecimento

No estabelecimento de genótipos (Fig. 16) verificaram-se diversas limitações tais como: uma elevada taxa de contaminação, a elevada libertação de compostos fenólicos e a intensa formação de calo nas zonas meristemáticas, o que condicionou todo o processo. Para o genótipo PJC a maior vulnerabilidade mostrou ser a contaminação que afectou cerca de 84% dos explantes (Fig. 17), enquanto para o genótipo A, o maior entrave foi a elevada oxidação dos tecidos vegetais com aproximadamente 50% afectados (Fig. 17). A oxidação de compostos fenólicos induzida pelos cortes no material vegetal, em *A. sellowiana* tem como consequência uma baixa taxa de sucesso. (Duarte *et al.*, 1992; Fachinello *et al.*, 1992).



Figura 16 Processo de estabelecimento do genótipo a partir do menistema apical da feijoa.

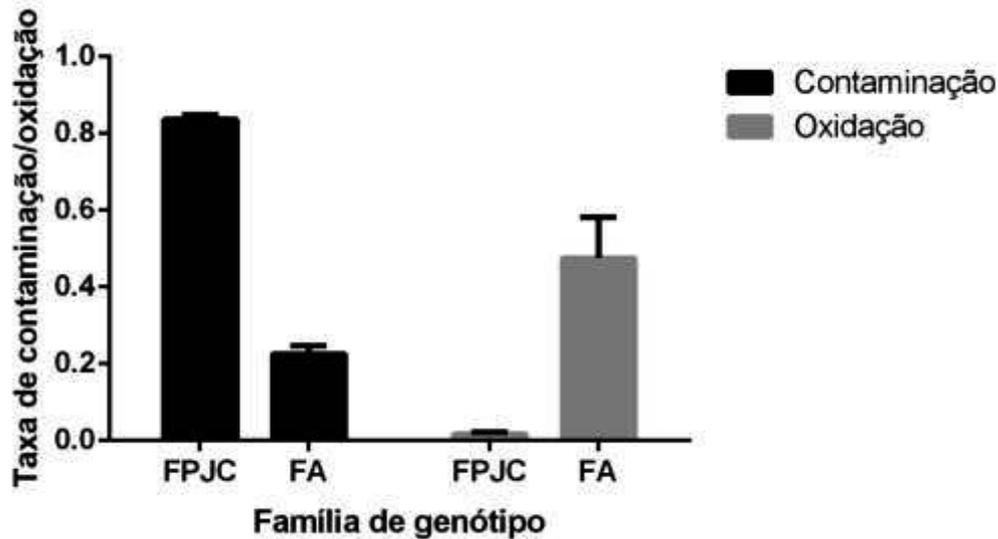


Figura 17 Relação das taxas de contaminação e oxidação nos diferentes genótipos (FPJC – Jardim de casa de particular e FA - Aveiro).

Para além dos protocolos de esterilização necessitarem de serem otimizados as características genóticas condicionam claramente o estabelecimento de uma planta adulta. A produção de compostos fenólicos varia consoante o genótipo e demonstrou ser um grande desafio no estabelecimento do genótipo A. Esta situação pode dever-se ao processo de esterilização ou até mesmo ao manuseio do explante ao longo de todo o processo desde o momento que é colhido até à sua cultura *in vitro*. No entanto, comparando ao genótipo PJC verificou-se uma acentuada taxa de contaminação levando-nos a crer que possivelmente o protocolo de esterilização não estaria a ser eficiente. Desta forma o estabelecimento de árvores adultas está condicionado pelo genótipo e deve adequar-se o tipo de tratamento a aplicar a cada explante, uma vez que estes respondem de forma diferente ao mesmo tratamento.

3.3. Embriogénese

Relativamente aos ensaios “one-step” e “two-step”, de uma forma geral não se verificaram diferenças significativas na indução de calo assim como na formação de embriões. Os ensaios foram analisados qualitativamente através da observação, desde o isolamento do embrião até ao desenvolvimento de plântulas (Fig. 18); e através de estatística, para avaliação da quantidade de calos formados, bem como de calo com capacidade para gerar embriões. Uma vez que Canhoto & Cruz (1996a), estabeleceram um protocolo de produção em massa de embriões somáticos baseado no método “one step”, este foi considerado um controlo positivo comparativamente ao método “two-step”. No entanto, o protocolo estabelecido no decorrer deste estudo foi adaptado ao protocolo de Canhoto e colaboradores (2009). Os embriões apresentaram algumas diferenças na sua fisiologia, o que não seria o esperado. No estudo controlo, os embriões apresentaram uma dimensão mais reduzida do que em ED1 e ED2 e na sua disposição geral apresentavam-se mais aglomerados e compactos, com presença evidente de embriões anómalos no estado cotiledonar. Embriões ED2 apresentaram um desenvolvimento rápido verificando uma menor quantidade de embriões no estado inicial ao 75º dia. Os embriões formados em meio ED1 apresentaram mais homogeneidade de desenvolvimento, com embriões maioritariamente na fase cotiledonar mais alongados de uma tonalidade branca translúcida, comparativamente aos restantes. Nos ensaios ED4 e ED5, os embriões apresentaram um tamanho reduzido e num estado desenvolvimento embrionário primário. Ao 75º dia os embriões de ED1 apresentavam uma coloração acinzentada devido a necrose dos tecidos embriogénicos adjacentes e eram facilmente destacáveis das células do tecido caloso. Essa característica revelou-se útil uma vez que permitiu colocar os embriões somáticos a germinar sem que fosse necessário colocar tecido caloso ou danificar o embrião.

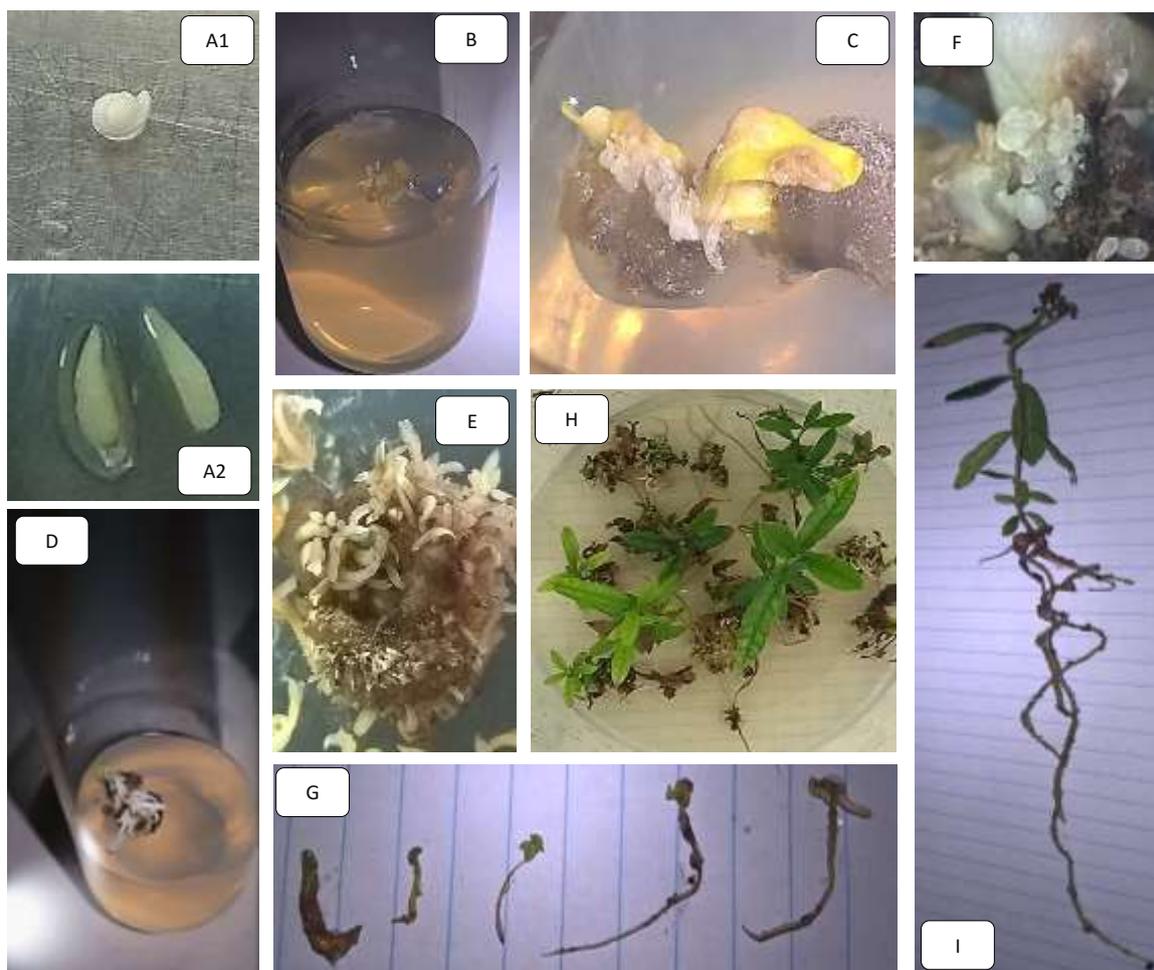


Figura 18 Processo de embriogênese somática. (A1) Embrião de feijoa; (A2) Embriões anômalos; (B) Formação de calo ao 15º dia; (C) Indução de embriões; (D) Calo com a presença de embriões desenvolvidos; (E) Embriões vistos à lupa com 75 dias de desenvolvimento; (F) Diferentes estados embrionários; (G) Desenvolvimento anômalo de embriões; (H) Plântulas de feijoa originadas por ES; (I) Plântula de feijoa desenvolvida.

3.3.1. Embriogênese “one-step” e “two-step”

A análise estatística mostrou a ausência de diferenças significativas na indução de embriogênese, sendo por um método “one-step” ou por outro “two-step”. A alteração de meio ao 35º dia para valores mais reduzidos de hormona e/ou sacarose não teve influência na capacidade de diferenciação do tecido, no entanto, a presença de hormona/sacarose pode ter influência no desenvolvimento morfológico do embrião,

como é possível de verificar visualmente. Estudos realizados por Guerra e colaboradores (2001) demonstram que uma exposição à hormona de quatro semanas é o suficiente para obter 93,7% de indução embriogénica na feijoa, o que até seria conveniente uma vez que interfere na polaridade dos embriões gerados (Canhoto & Cruz, 1996a; Pescador *et al*, 2008; Feher, 2003). Consequentemente, estes não conseguem efetuar uma primeira divisão polar, levando ao aparecimento de anormalidades no desenvolvimento. O objectivo pretendido seria verificar se a alteração dos parâmetros no desenvolvimento do embrião permitiria contornar o efeito adverso do contacto com a auxina e se, consequentemente, haveria um decréscimo do número de embriões anómalos, possibilitando, assim, o incremento da taxa de embriões somáticos germinados.

O tempo de exposição dos calos à hormona foi de 35 dias, apresentado posteriormente desenvolvimento.

3.3.2. Maturação de embriões

A taxa de maturação/ conversão de embriões a plantas foi calculada de acordo com o número de calos embriogénicos existentes. Desta forma os valores obtidos são reflexo do número de embriões somáticos germinados correctamente, tendo em conta que foi utilizado um determinado número de embriões zigóticos (cada calo representa um embrião zigótico utilizado). Foram consideradas plantas desenvolvidas segundo os parâmetros: mais de 2 cm de altura, 2 ou mais pares de folhas e raiz inicial bem desenvolvida. O método de embriogénese “two-step” demonstrou ser mais eficaz, apresentando valores de conversão quase sempre superiores ao método “one step”. O ensaio EDA5 funcionou como um controlo positivo e constituiu o valor mais baixo de conversão de plantas. Neste ensaio (EDA5) foi utilizada a indução “two step” e mantiveram-se as condições do meio inicial de indução. No ensaio ECA contínuo (“one-step”), menos de 10% dos calos geraram plantas, como é visível no gráfico da

Figura 19. O ensaio EDA1 embora tenha tido uma germinação inicial muito rápida (5-7 dias) e um elevado número de embriões, estes não foram capazes de se desenvolver em plantas, o que se refletiu tanto na elevada percentagem de calos inviáveis, como sugere que a acumulação de reservas não terá sido suficiente para dar seguimento ao processo (Fig. 19). O ensaio que obteve melhor desempenho foi o EDA 2 com 25% dos calos a originarem plantas (Fig. 19)., seguindo-se o EDA3 (14,81%) e o EDA4 (13,89%) Tais resultados levam-nos a assumir que, para além da importante diminuição da concentração de 2,4-D, também a diminuição da concentração de sacarose no processo de desenvolvimento do embrião pode estar relacionada com uma melhor maturação e posterior conversão dos embriões a plantas. Estudos com ABA adicionado ao meio de maturação revelaram uma grande importância desta hormona na aquisição de substâncias de reserva.

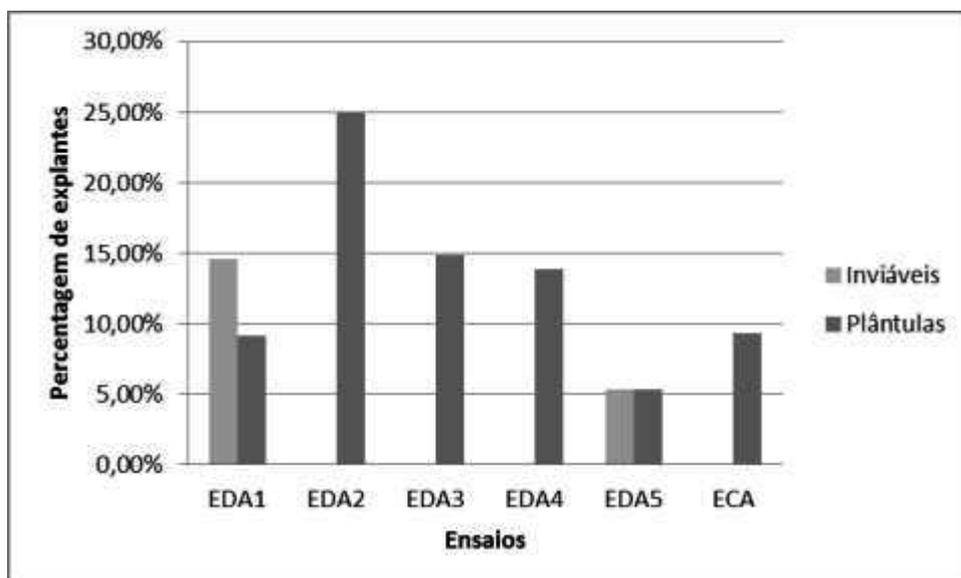


Figura 19 Percentagem de explantes que após maturação se revelaram inviáveis e percentagem de embriões que se desenvolveram em plântulas.

3.3.3. Choque auxínico

Comparação da ação de diferentes hormonas ao choque auxínico.

Neste estudo foram verificadas as reações do explante a dois tipos de auxinas (2,4-D e IBA), a uma concentração elevada, com o intuito de induzir a embriogénese somática através de choque auxínico. Verificou-se que a indução da embriogénese através de 2,4-D foi capaz de gerar uma maior produção de calo para qualquer que fosse o tempo de contacto do embrião zigótico com a solução concentrada (100mg/l) de auxina, tendo sido praticamente 100% eficaz (Fig. 20). Algo que não se verificou quando a hormona testada foi o IBA, pois esta revelou induzir um fraco desenvolvimento de calo para os primeiros períodos de 5h e 10h, tendo este último período de tempo revelado a taxa mais baixa de indução. Para 20 horas e 40 horas de contacto com esta hormona verificaram-se melhores resultados de indução, mas só com uma exposição de 40 horas é que cerca de metade dos explantes revelaram capacidade de diferenciação celular (Fig. 20).

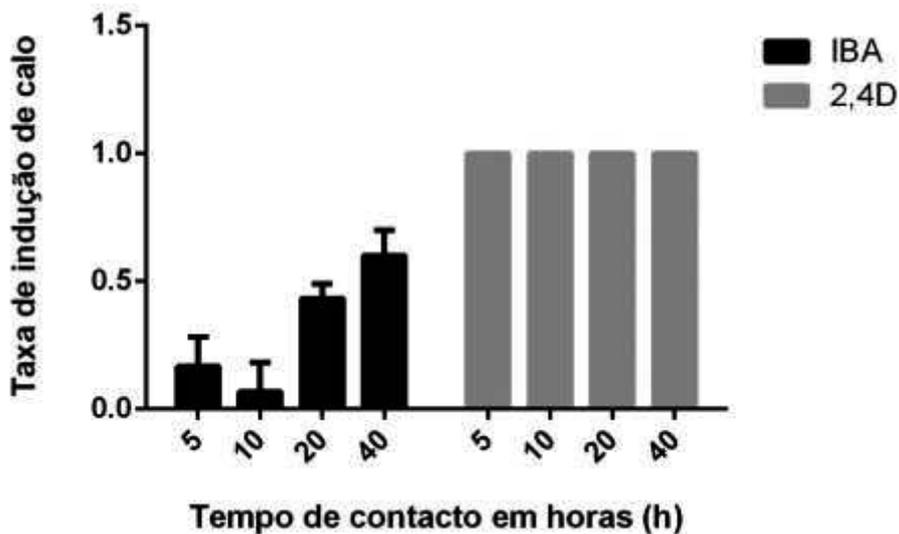


Figura 20 Taxas de formação de calo, das hormonas 2,4-D e IBA, analisando a variável tempo de contato (horas).

Analisando a quantidade de calos que produziram embriões por calo formado foi possível verificar que existe uma elevada discrepância de valores entre as duas hormonas sujeitas à situação de choque auxínico. Os embriões produzidos por choque auxínico surgiram por volta de mês e meio de cultura. O choque auxínico através de IBA apresentou taxas superiores a 0,5 (Fig.21). Os valores mais altos de taxa de indução de embriões por calo obtido verificaram-se em inoculações de 20 e 40 horas, representado quase o dobro da eficácia embriogénica em relação às exposições de tempo inferior e alcançando quase a totalidade dos calos contendo embriões somáticos (Fig.21). Ao passo que a capacidade embriogénica foi crescente com IBA em relação ao tempo de exposição, utilizando o 2,4-D os valores são inversos, pois à medida que vai aumentando o tempo de contacto com a hormona os calos revelam menos aptidão para diferenciação em embriões sendo quase nula para 20 e 40 horas de inoculação. Podemos ainda verificar que para t=5 horas o número de calos que apresenta embriões por calo formado é semelhante às duas hormonas (Fig.21).

Comparando a taxa de indução com a capacidade dos calos induzidos produzirem embriões (Figs. 20 e 21) podemos verificar que apesar da taxa de indução de calo ser superior não significa que este tenha a capacidade de originar embriões somáticos. A taxa de indução de calo só se torna interessante no processo de indução de embriogénese somática quando apresenta um elevado número de diferenciação. Desta forma, utilizando este método o ensaio que se revelou mais eficiente foi o choque auxínico utilizando 2,4-D num tempo de exposição de 5 horas.

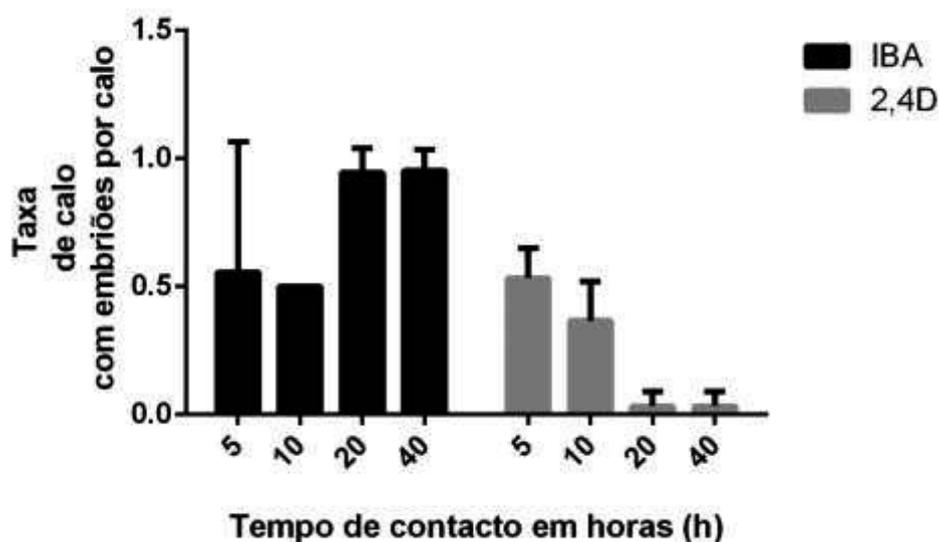


Figura 21 Taxas de embriões por calo formado, com as hormonas 2,4-D e IBA, analisando a variável tempo de contato (horas).

Comparando o comportamento dos embriões zigóticos submetidos a diferentes concentrações de IBA em diferentes tempos de permanência com a hormona é possível concluir que o número de calos com embriões segue um padrão de desenvolvimento em função do tempo de exposição, sendo esta observação mais evidente na concentração de 0,25mg/l de IBA, como é possível ver no gráfico da Figura 22. O melhor desempenho comum foi obtido com 4 horas de inoculação. De uma forma geral foi possível uma maior obtenção de embriões com concentração de 0,25 mg/l de IBA, no entanto o elevado tempo de exposição a tal concentração resultou na formação de um maior número de embriões anómalos. De uma forma simples verifica-se que o gráfico da Figura 22 se assemelha a um sino, em que a quantidade de embriões é crescente até t=4, sendo esse o valor máximo e posteriormente decresce. Estes resultados vão de encontro aos de Marques (2002), que verificou que para concentrações de 0,25g/l de 2,4-D as culturas apresentavam o mesmo comportamento relativamente à formação de embriões. Para a concentração de IBA a 0,1 g/l numa hora de inoculação verificou-se um número bastante elevado de embriões, dos restantes valores, havendo por isso a possibilidade do valor não ser próximo do real.

Guerra e colaboradores verificaram que baixas exposições a 2,4-D resultavam numa rápida diferenciação e desenvolvimento dos embriões somáticos, que culmina num aumento da taxa de germinação. Segundo Marques (2002), o choque auxínico utilizando 2,4-D em concentrações a partir de 0,5 mg/l demonstraram pouco desenvolvimento de embriões sendo que para uma concentração de 1g/l de 2,4-D o contacto tornou-se tóxico para o explante após três horas de exposição.

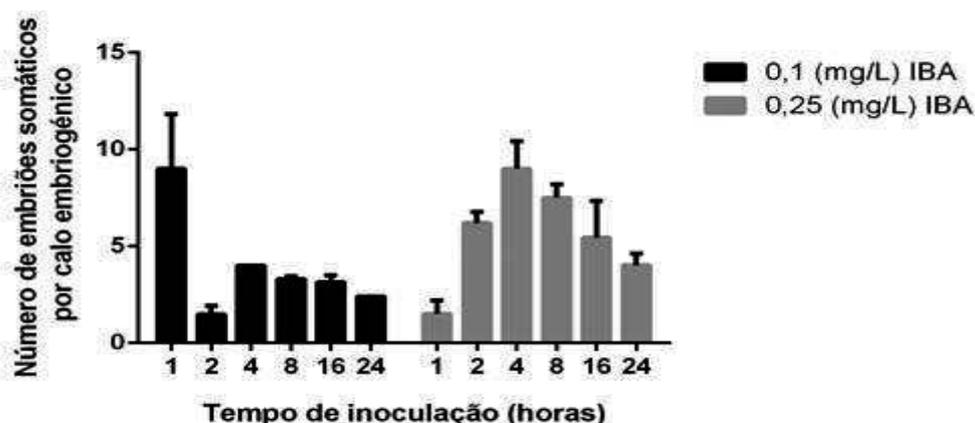


Figura 22 Número de embriões somáticos por calo embriogénico, com a hormona IBA, analisando a variável concentração (mg/L).

3.3.4. Efeito de AGP na embriogénese somática

Neste ensaio de embriogénese foram testados os efeitos de diferentes concentrações de AGP no meio de cultura. Numa primeira fase, foram utilizados embriões da família PJC, para analisar a influência da concentração de sacarose adicionada ao meio; e, numa segunda fase foi observado o impacto do genótipo (PJC comparado com A). Em ambas as situações os embriões do ensaio controlo germinaram sem que houvesse produção de calo.

Influência da sacarose no meio de indução

A taxa de indução de calo utilizando AGP, foi inferior 50%. A indução mostrou ser mais competente para uma concentração de sacarose de 3%. Os melhores resultados na indução de calo foram atribuídos às concentrações 1 e 2 mg/l de AGP utilizando o meio suplementado com 3% (p/v) de sacarose. O meio de cultura 4 AGP a 3% de sacarose obteve menos de metade do valor de indução dos meios anteriores, sendo que para a mesma quantidade de sacarose o valor mais baixo de eficácia foi atribuído ao meio 8 AGP, sendo também o valor mais baixo em estudo (Fig. 23).

Como é possível observar no gráfico da Figura 23, os meios suplementados com 9% sacarose permaneceram com uma taxa geralmente abaixo dos 0,2. Estes meios apresentam apenas algumas oscilações não evidenciando muita diferença entre si na indução de calo. O meio de cultura 1AGP e 4AGP obtiveram o mesmo valor de taxa de indução calo (0,15).

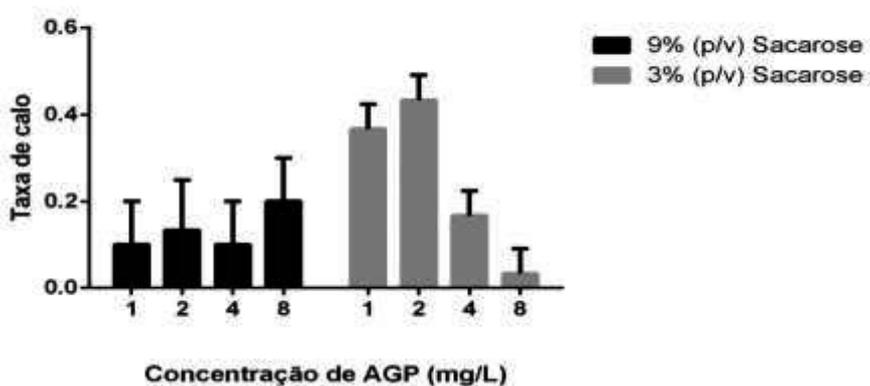


Figura 23 Taxa de formação de calo segundo diferentes concentrações de AGP e diferentes percentagens de sacarose.

Associando a taxa de indução de calo à taxa de formação de calos que geraram em embriões somáticos constatou-se que a maioria dos calos originou embriões somáticos. Tal como anteriormente verificou-se que o meio de cultura contendo AGP a 3% de sacarose demonstrou maior eficácia (Fig. 24). Parte dos calos gerados em 2AGP não formaram embriões colocando-se ao mesmo nível do meio contendo 1 mg/l AGP, e considerando os dados do gráfico anterior podemos então retirar que o meio AGP1 foi

mais eficiente obtendo uma formação de embriões por calo gerado superior que o AGP2, apesar de terem uma taxa de produção de embriões semelhantes. Estudos em trigo que revelaram que as AGPs detêm um papel importante na indução de embriogênese somática em micrósporos de trigo assim como na viabilidade dos micrósporos qualidade e número de embriões que se desenvolveram em plantas (Letarte *et al.*, 2005)

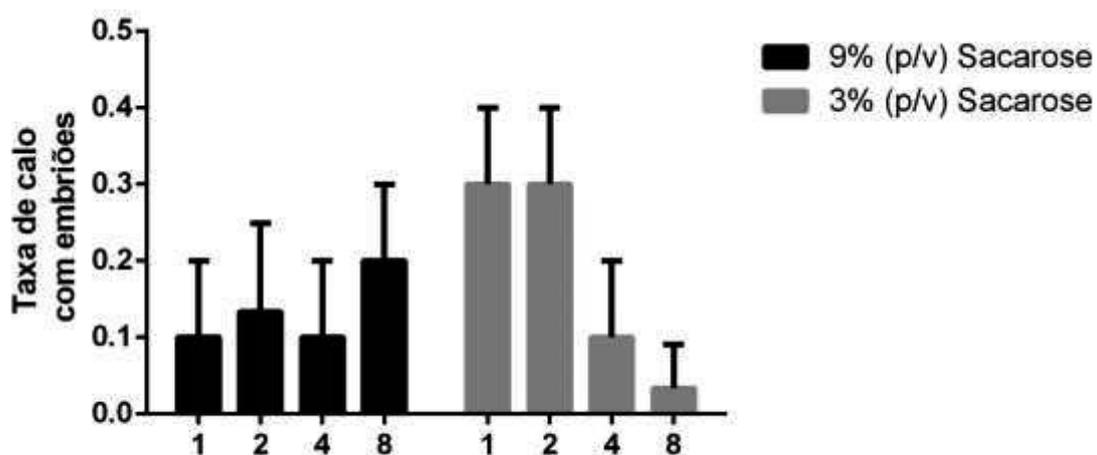


Figura 24 Taxa de formação de calo com embriões segundo diferentes concentrações de AGP e diferentes percentagens de sacarose.

Impacto do genótipo

Tendo em conta o gráfico da Figura 25, é possível verificar de uma forma geral que o genótipo A desenvolveu calo de uma forma crescente isto é, quanto maior a concentração de AGP maior o desenvolvimento de calo por explante. Relativamente ao comportamento do genótipo PJC verificou-se o inverso da situação descrita anteriormente. Os melhores desempenhos verificaram-se para concentrações de AGP mais reduzidas decrescendo à medida que estas aumentavam. No genótipo PJC à concentração 2mg/l de AGP, observa-se um ligeiro decréscimo da taxa de indução comparativamente à anterior. O mesmo se verifica no genótipo A em que a tendência é o decréscimo da taxa de indução de calo à medida que a concentração de AGP aumenta, porém para 2mg/l de AGP a indução é superior comparativamente a 1mg/l de AGP (Fig. 25).

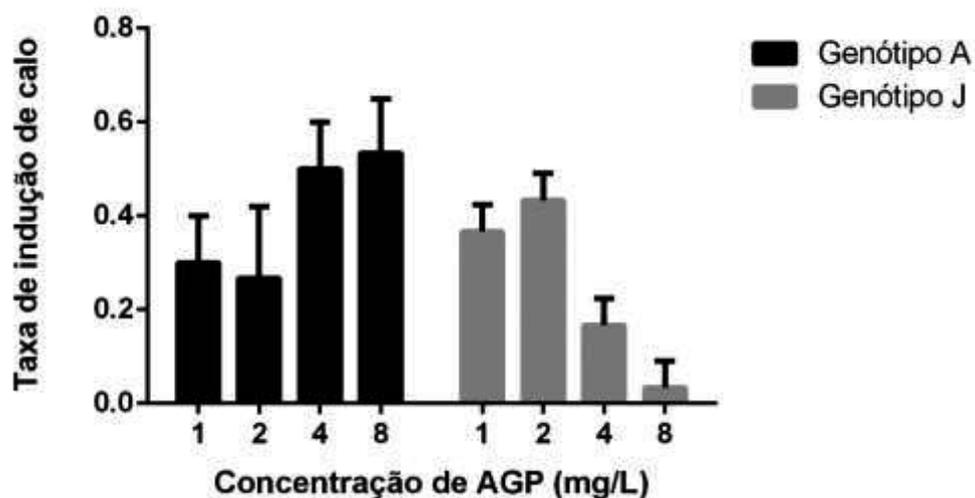


Figura 25 Taxa de indução de calo segundo diferentes concentrações de AGP e diferentes genótipos.

Observou-se que dependendo da família de genótipos existem diferenças significativas no comportamento do explantes respetivamente à formação de embriões, considerando a família de PJC com maior aptidão para a indução de embriogénese. Tal já havia sido observado na feijoa por Canhoto e Cruz (1996a) e posteriormente por Guerra e colaboradores (1997), o mesmo foi verificado noutras espécies lenhosas (Attree & Fowke, 1993). O genótipo A obteve taxa de calo com embriões por explante muito próximas independente da concentração de AGP utilizada no meio (Fig. 26). Percebe-se que o número de calos indiferenciados com competência para produzir embriões é muito baixa no genótipo A, e apesar de ter tido maior indução de calo que o genótipo PJC nem todos desenvolveram embriões, sendo por isso o genótipo PJC considerado mais competente.

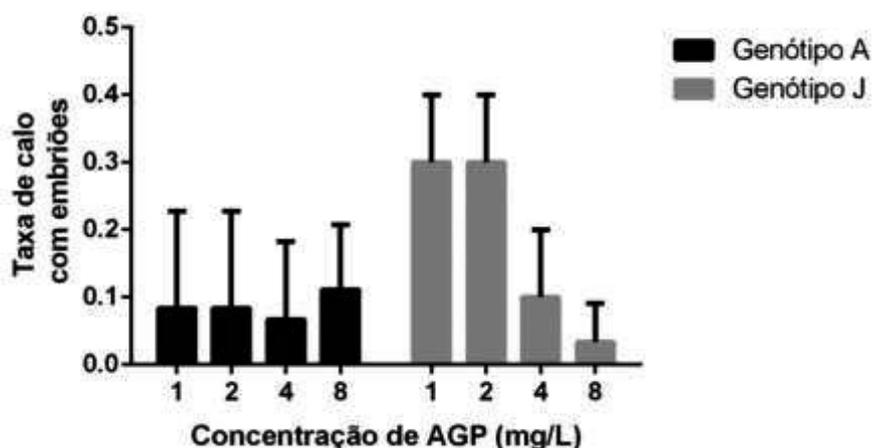


Figura 26 Taxa de formação de calo com embriões segundo diferentes concentrações de AGP e diferentes genótipos.

3.3.5. Estudos morfológicos e histológicos

Os estudos histológicos foram realizados utilizando o corante azul de toluidina, como intuito de analisar os tecidos dos diferentes ensaios de embriogênese somática (35D) para detectar alguma diferença a nível estrutural (Fig.27).

No estado globular mais desenvolvido os embriões tendem a tornar-se mais alongados na região periférica (ED1b). Na região mais interior do embrião, as células apresentam uma constituição semelhante, contudo são maiores e mais circulares e possuem maiores espaços entre elas. Ainda é possível verificar as células do suspensor na base do embrião. No estado cotiledonar, é evidente a grande quantidade de substâncias de reserva acumuladas, bem como a presença da camada epidérmica. É possível verificar em ED2 e ED5 diversos grânulos de amido. Em relação à acumulação de substâncias de reserva verificam-se ligeiras diferenças sendo o embrião resultante do processo de embriogênese ED2 o que apresenta maior quantidade.

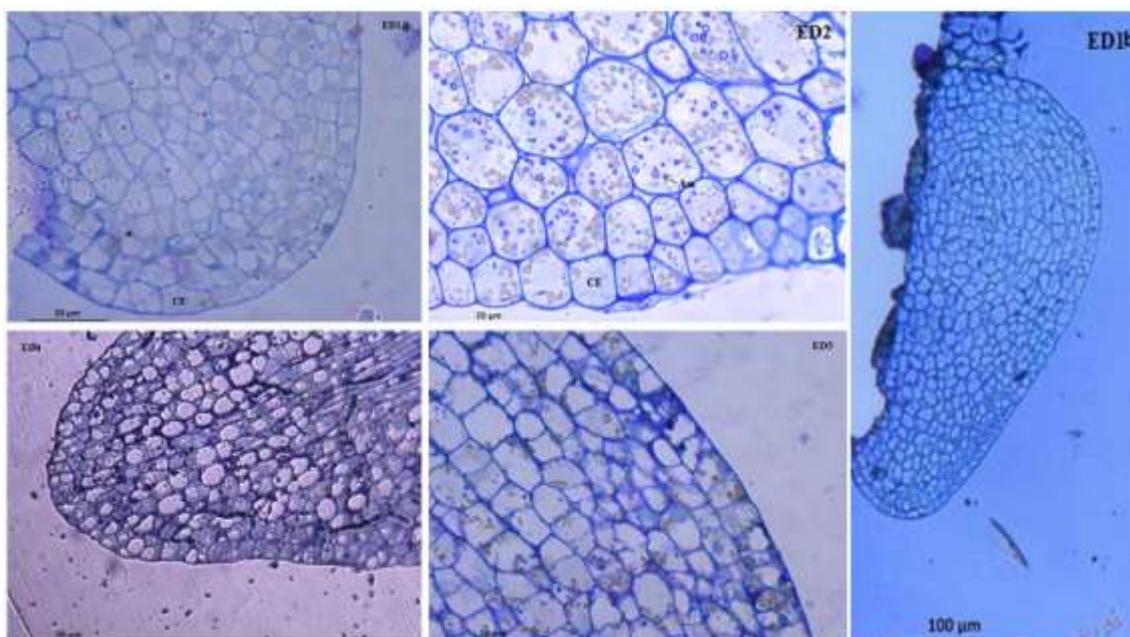


Figura 27: Estudos histológicos dos embriões somáticos de feijoa (coloração com azul de toluidina). Cortes transversais de cotilédones (ED1a, ED2 , ED4 e ED5); Corte longitudinal de embrião globular com suspensor presente (ED1b); CE- células epidérmicas; Am-amido.

4. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Segundo Donazzolo e colaboradores (2015) o armazenamento de sementes por um período superior a um ano, à temperatura ambiente, não é viável uma vez que a taxa de germinação das sementes decresce acentuadamente, algo que já tinha sido verificado anteriormente por Wielewicki *et al.* (2006).

Assim, e considerando a finalidade do armazenamento de sementes de feijoa, não é possível manter taxas aceitáveis de germinação (Wielewicki *et al.* 2006) por um ano com armazenamento à temperatura ambiente, o que foi verificado no presente trabalho, já que as sementes mantiveram, em média 21,7% de germinação.

A micropropagação utilizando uma baixa concentração de zeatina promove um bom desenvolvimento da planta, assim como a formação de raízes nas plantas micropropagadas e uma diminuta formação de calo nos tecidos em contacto com o meio de cultura.

O estabelecimento de genótipos a partir de explantes de árvores adultas tem como principal entrave a esterilização e oxidação de tecidos devido à elevada produção de composto fenólicos.

A conservação das sementes é um factor a ter em conta quando se pretende induzir embriogénese através de um embrião zigótico, uma vez que a viabilidade decresce acentuadamente ao longo do tempo.

Foi ainda possível concluir que a indução de embriogénese não é dependente da utilização de auxinas.

Os resultados obtidos ao longo do trabalho desenvolvido, sugerem que a correcta manipulação dos reguladores de crescimento de *A. sellowiana* na fase de indução é o factor chave para estabelecer um protocolo regenerativo e de viabilidade comercial neste sistema de micropropagação.

Verificou-se ser possível a indução da embriogénese somática na feijoa através de AGP, uma vez que os embriões apresentaram uma maior homogeneidade de desenvolvimento. Existe a necessidade de otimizar este protocolo e avaliar a fixação das características genéticas e a produção em massa de embriões, assim como seria necessário esclarecer o papel do AGP na embriogénese somática e o efeito deste no desenvolvimento desses embriões a plântulas.

A indução de embriogénese somática em *Acca sellowiana* tem sido instigada a partir de embriões zigóticos maduros. No entanto, embora esta metodologia, permita estudar o

processo de indução, tem limitações do ponto de vista da clonagem de árvores *plus*, uma vez que as sementes apresentam uma forte diversidade genética. Deste modo, importa apostar na indução de embriogénese a partir de tecidos adultos com o objectivo de conseguir a clonagem de genótipos interessantes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amarante, C. T. & Santos, K.L. (2011). FEIJOA (*Acca sellowiana*). Revista Brasileira Fruticultura, V. 33, Nº1, p. 001-334.

Amarante, C.T., Steffens, C.A., Benincá, T., Hackbarth, C. & Santos, K.L. (2013). Qualidade e potencial de conservação pós-colheita dos frutos em cultivares brasileiras de goiabeira-serrana. Revista Brasileira Fruticultura, Jaboticabal - SP, v. 35, Nº 4, p. 990-999.

Andrade, E.R.; Ducroquet, J.P.H.J. Antracnose em Goiabeira-Serrana. Horti Sul, v.3, n.2, p. 21-25. 1994.

Attree, M.S. & Fowke, L.C., (1993), Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers : Plant Cell, Tissue and Organ Culture 35: 1-35, 1993

Basile, A., Vuotto, M.L., Violante, U., Moscatiello, V., Sorbo, S., Martone, G. & Castaldo-Cobianchi (1997). Antibacterial activity in *Actinidia Chinensis*, *Feijoa sellowiana* and *Aberia caffra*. International Journal of Antimicrobial Agents 8, 199-203.

Bontempo, P., Mita, L., Miceli, M., Doto, A., Nebbioso, A., De Bellis, F., Conte, M., Minichiello, A., Manzo, F., Carafa, V., Basile, A., Rigano, D., Sorbo, S., Cobianchi, R.C., Schiavone, E.M., Ferrara, F., De Simone, M., Vietri, M.T., Cioffi, M., Sica, V., Bresciani, F., de Lera, A.R., Altucci, L. & Molinari, A.M. (2007). *Feijoa sellowiana* derived natural Flavone exerts anti-cancer action displaying HDAC inhibitory activities. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 39, 1902-1914.

Cacioppo, O. La Feijoa. Madrid: Ediciones Mundi Persa, 1988. 85p

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., Caprestano, C.A., Ducroquet, J.P. & Guerra, M.P. (2007). Competência embriogenética em tecidos florais de *Acca sellowiana* (Myrtaceae). Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 87-89.

- 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, v.44, n.3, p.217-224.
- Canhoto, J.M.,** (1994). *Feijoa sellowiana* Berg.(Myrtaceae): Estudos sobre embriogênese e outros tipos de morfogênese. Tese de doutoramento FCTUC
- Canhoto, J.M.,** Mesquita, J.F. & Cruz, G.S. (1996). Ultrastructural Changes in Cotyledons of Pineapple Guava (Myrtaceae) During Somatic Embryogenesis. *Annals of Botany* 78: 513-521.
- Canhoto, J.M. & Cruz, G.S.** (1996a). Histodifferentiation of somatic embryos in cotyledons of pineapple guava (*Feijoa sellowiana* Berg). *Protoplasma*, 191: 34-45.
- Canhoto, J.M. & Cruz, G.S.** (1996b). *Feijoa sellowiana* Berg (Pineapple Guava). *Biothecnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 35.
- 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.,** Correia, S.M. & Marques, C.I. (2009). Factors Affecting Somatic Embryogenesis Induction and Development in *Feijoa sellowiana* Berg. Proc. 1st is on Biotechnol. of Fruit Species, Eds.: M. - V. Hanke et al., Acta Hort. 839, ISHS.
- Chawla H. S.,** (2010) Introduction to Plant Biotechnology (3^a Ed). Science Publishers, Inc Enfield, NH, USA.
- Correia, S.M. & Canhoto, J.M.,** (2010). Characterization of somatic embryo attached structures in *Feijoa sellowiana* Berg. (Myrtaceae). *Protoplasma* 242: 95-107.
- Donazzolo, J.,** Ornellas, T.S., Bizzocchi, L., Vilperte, V. & Nodari, R.O. (2015). O armazenamento refrigerado prolonga a viabilidade de sementes de goiabeira-serrana. *Revista Brasileira Fruticultura*, Jaboticabal - SP, v. 37, n. 3, p. 748-754.
- Duarte, O.R.,** Fachinello, J.C. & dos Santos Filho, B. (1992). Multiplicação da Goiabeira Serrana através de Estacas Semilenhosas. *Pesq. agropec. bras.* Brasília, 27 (3): 513-516.

- Ducroquet, J.P.;** Hickel, E.R. 1997. Birds as pollinators of Feijoa (*Acca sellowiana* Berg). Horticulturae, 452: 37-40.
- Ducroquet, J.P.** Ribeiro, P.A. 1991. Goiaba serrana, velha conhecida: nova alternativa. Revista Agropecuária Catarinense, EMPASC, Florianópolis, 4: 27-29.
- Ducroquet, J.P** Hickel, E.R Nodari, R.O. Goiabeira-Serrana (*Feijoa sellowiana*). Série Frutas nativas 5; Jaboticabal:Funep, 2000. 66
- Ellis, M.,** Egelund, J., Schultz, C.J. & Bacic, A. (2010). Arabinogalactan-Proteins: Key Regulators at the Cell Surface. Plant Physiology, Vol. 153, pp. 403-419.
- Fachinello, J.C.** & Nachtigal, J.C. (1992). Propagação da goiabeira-serrana *Feijoa sellowiana* Berg, através da mergulhia de cepa. Scientia Agricola, Piracicaba-SP, 49 (1): 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.
- Fehér, A.** (2005). Why Somatic Plant Cells Start to form Embryos?. Plant Cell Monogr (2), A. Mujib - J. Samaj: Somatic Embryogenesis. DOI 10.1007/7089_019/.
- Figuroa, F,** Herrera, R., Avalos, M. & Vargas, M. (2006). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. Plant Cell Tiss Organ Cult 86: 285-301.
- Finardi, C.** (2003) Caracterização da Biologia Reprodutiva da Goiabeira-Serrana (*Acca sellowiana* Berg.). Dissertação mestrado Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Santa Catarina.
- Gao, M.,** & Showalter, A.M. (2000). Immunolocalization of LeAGP-1, a modular Planta 210: 865-874.
- Gomes, J.P.,** de Oliveira, L.M., França S. S., Lopes, R., Dacoregio H.M. (2015). Caracterização morfológica de plântulas durante a germinação de sementes de *Psidium cattleianum* e *Acca sellowiana* (Myrtaceae) Ciência. Florestal vol.25 no.4 Santa Maria

- Gomes, J.P.**, de Oliveira, L.M., Saldanha, A.P., Manfredi, S. & Ferreira, P.I. (2013). Secagem e Classificação de Sementes de *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret – Myrtaceae quanto à Tolerância à Dessecação e ao Armazenamento. *Floresta e Ambiente*, 20(2): 207-215.
- Gomes, J.P.**, de Oliveira, L.M., Ferreira, P.I. & Batista, F. (2016). Substratos e temperaturas para teste de germinação em sementes myrtaceae. *Ciência Florestal*, Santa Maria, v. 26, n. 4, p. 285-293.
- Guerra, M.P.**, Pescador M.P., Dal Vesco L.L., Nodari, R.O, Ducroquet,J.P., 1997. Invitro morphogenesis in *Feijoa sellowiana*: somatic embryogenesis and plant regeneration. *Acta Horticulturae*452:27-36.
- Guerra, M.P.**, Dal Vesco, L.L., Ducroquet,J.P., Nodari, R.O. & Reis, M.S. (2001). Somatic embryogenesis in goiabeira serrana: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13(2):117-128.
- Harman, J.E.** Feijoa fruit: growth and chemical composition during development. *New Zealand Journal of experimental Agriculture*, v.15, p.209-215. 1987
- Herman, E.M.** & Lamb, C.J. (1992). Arabinogalactan-Rich Glycoproteins Are Localized on the Cell Surface and in Intravacuolar Multivesicular Bodies. *Plant Physiol.* 98, 264-272.
- Jiménez, V.M.** (2005). Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation* 47: 91-110.
- Kreuger, M.** & van Hoist, G.J. (1993). Arabinogalactan proteins are essential in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Planta* 189: 243-248.
- Kumar, S.** & Nadgauda, R. (2010). Control of Morphological Aberrations in Somatic Embryogenesis of *Commiphora wightii* (Arnott) Bhandari (Family: Bursaraceae) Through Secondary Somatic Embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.*

Letarte, J., Simion, E., Miner, M. & Kasha, K.J. (2006). Arabinogalactans and arabinogalactan-proteins induce embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore culture. *Cell biology and morphogenesis, Plant Cell Rep*, 24: 691-698.

Letarte, J., Simion, E., Miner, M. & Kasha, K.J. (2006). Arabinogalactans and arabinogalactan-proteins induce embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore culture. *ERRATUM, Plant Cell Rep*, 25: 877.

Lim T.K. (2012), *Acca sellowiana*, Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants: Volume 3, Fruits

Litwinczuk, W., Szczerba, G. & Wrona, D. (2005). Field performance of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. 'Herbert' propagated by cuttings and tissue culture. *Scientia Horticulturae* 106, 162-169.

Majewska-Sawka, A. & Nothnagel, E.A. (2000). The Multiple Roles of Arabinogalactan Proteins in Plant Development. *Plant Physiology*, Vol. 122, pp. 3-9.

Marques, M.R., (2002). Ensaio para a otimizar a indução e desenvolvimento de embriões somáticos em *Pinus pinaster* Aintone *Feijoa sellowiana* Berg. Tese de mestrado FCTUC

Mattos, J.R. A Goiabeira-Serrana. Porto Alegre: Instituto de Pesquisas de Recursos Naturais Renováveis, (publicação IPRNR, 19), 1986. 84p.

Merkle, S.A., Parrot, W.A. & Flinn, B.S. (1995). Morphogenic Aspects of Somatic Embryogenesis. T.A. Thorpe (ed.). *In Vitro Embryogenesis in Plants*, pp. 155-203.

Motohashi, N., Kawase, M., Shiratak, Y., Tani, S., Saito, S., Sakagami, W., Kurihara, T., Nakashima, H., Wolfard, K., Mucs, I., Varga, A. & Molnar, J. (2000). Biological Activity Of Feijoa Peel Extracts. *Anticancer research*, Vol. 20: 4323-4330.

Nakashima, H. (2001). Biological activity of feijoa peel extracts. Kagoshima University Research Center for the Pacific Islands, Occasional Papers N° 34, 169-175.

Nothnagel, E.A. (1997). Proteoglycans & Related Components in Plant Cells. *International Review of Cytology*, Vol. 174.

Oltramari, A.C., Dal Vesco, L.L., Pedrotti, E.L., Ducroquet, J.P., Nodari, R.O. & Guerra, M.P. (2000). Protocolo de micropropagação da goiabeira serrana (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 61-68.

Parra, A. & Fischer, G. (2013). Maduración y comportamiento poscosecha de la feijoa (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret) - Una revisión. *Revista colombiana de ciências hortícolas*, Vol. 7 – Nº 1, pp. 98-110.

Pescador, R., 2004. Aspectos fisiológicos e estruturais das embriogêneses zigótica e somática de *Feijoa sellowiana* Berg., Myrtaceae. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo

Pescador, R., Kerbauy, G.B., Viviani, D. & Kraus J.E. (2008). Anomalous somatic embryos in *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret (Myrtaceae). *Revista Brasil. Bot.*, V.31, n.1, p.155-164.

Pescador, R., Kerbauy, G.B., Santos G.B., Dal Vasco L.L, Fraga. H.P, Guerra.M.P., (2012) Comparative study of reserve lipid accumulation during somatic and zygotic *Acca sellowiana* (O.Berg.) Burret embryogenesis. *Acta Physiologiae Plantarum*.

Rego, S.S., Nogueira, A.C., Kuniyoshi, Y.S. & Santos, A.F. (2009). Germinação de sementes de *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) Berg. Em diferentes substratos e condições de temperaturas, luz e humidade. *Revista Brasileira de Sementes*, vol. 31, nº 2, p.212-220.

Roy, S., Jauh, G.Y., Hepler, P.K. & Lord E.M. (1998). Effects of Yariv phenylglycoside on cell wall assembly in the lily pollen tube. *Planta* 204: 450-458.

Ruberto, G. & Tringali, C. (2004). Secondary metabolites from the leaves of *Feijoa sellowiana* Berg. *Phytochemistry* 65, 2947–2951

Santos, K.L.; Finardi, C.; Ducroquet, J.P.; Nodari, R.O. Caracterização genética dos acessos do banco de germoplasma de Goiabeira-Serrana (*Acca sellowiana*)” In: congresso brasileiro de fruticultura, XVII, Belém, PA, 2002, SBF, Jaboticabal, CD-Room, p.1-5. 2002.

Santos, K.L., Peroni, N., Guries, R.P. & Nodari, R.O. (2009). Traditional Knowledge and Management of Feijoa (*Acca sellowiana*) in Southern Brazil. *Economic Botany*, 63 (2), pp. 204-214.

Sazima, I.; Sazima, M. (2007) Petiscos florais: pétalas de *Acca sellowiana* (Myrtaceae) como fonte alimentar para aves em área urbana no Sul do Brasil. *Biota Neotropica*, São Paulo, v.7, n.2, p.307-311

Sharp, W.R. (1980). The Physiology of InVitro Asexual Embryogenesis. *Horticultural Reviews* 268-310, Edited by Jules Janick.

Showalter, A.M., (2001). Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 58, 1399-1417.

Souza, V. C.; Lorenzi, H.(2005) Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias das angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 640 p.

Stefanello, S., Dal Vesco, L.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.

Stewart, A.M. & Craig, J.L. (1987). J.L. Factors affecting pollinator effectiveness in *Feijoa sellowiana*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 17:145-154.

Stewart, A.M. & Craig, J.L. (2012). Factors affecting pollinator effectiveness in *Feijoa sellowiana*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 17:2, 145-154, DOI: 10.1080/01140671.1989.10428023.

Thorp, G.; Bieliski, R.(2002) Feijoas: Origins, Cultivation and Uses. HortResearch. Ed. David Bateman, 87p.

Umehara, M. & Kamada, H. (2005). Development of the embryo proper and the suspensor during plant embryogenesis. *Plant Biotechnology* 22, 253-260.

van Hengel, A.J., van Kammen, A. & de Vries, S.C. (2002). A relationship between seed development, Arabinogalactan-proteins (AGPs) and the AGP mediated promotion of somatic embryogenesis. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM* 114: 637-644.

Vuotto, M.L., Basile, A., Moscatiello, V., De Sole, P., Castaldo-Cobianchi, R., Laghi, E. & Ielpo, M.T. (2000). Antimicrobial and antioxidant activities of *Feijoa sellowiana* fruit. *International Journal of Antimicrobial Agents* 13: 197-201

Wielewicki, A.P., Leonhardt, C., Schlindwein, G. & Souza Medeiros, A.C. (2006). Proposta de padrões de germinação e teor de água para sementes de algumas espécies florestais presentes na região sul do Brasil. *Revista Brasileira de Sementes*, vol. 28, nº 3, p.191-197.

Yeung, E.C. (1995). Structural and Developmental Patterns in Somatic Embryogenesis. T.A. Thorpe (ed.), *In Vitro Embryogenesis in Plants*, pp. 205-247. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.

Yoruk, R. & Marshall, M.R. (2003). Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. *Journal of Food Biochemistry* 27: 361-422.

Zimmerman, J.L. (1993). Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. *The Plant Cell*, Vol. 5, 1411-1423.