



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Miguel Neves Ferreira Batalha

**EFEITO DE FATORES DE STRESSE NA INDUÇÃO DE  
EMBRIOGÉNESE SOMÁTICA DE FEIJOA [*ACCA  
SELLOWIANA* (O. BERG) BURRET]**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia  
Vegetal orientada pelo Professor Doutor Jorge Manuel Pataca Leal Canhoto e  
apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de  
Coimbra

Julho de 2022

**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA**

Faculdade de Ciências e Tecnologias

Universidade de Coimbra

**Efeito de fatores de stresse na indução de  
embriogénese somática de Feijoa [*Acca  
sellowiana* (O. Berg) Burret]**

Miguel Neves Ferreira Batalha

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

2022



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA



## **Agradecimentos**

No final deste trabalho não posso deixar de agradecer às pessoas que me acompanharam e ajudaram ao longo do meu percurso de mestrado, tornando possível a sua concretização.

Em primeiro lugar agradeço ao Professor Doutor Jorge Canhoto por tudo o que me ensinou, pelo apoio científico, orientação, a dedicação e as críticas construtivas durante o processo de revisão.

Aos meus amigos Alberto, Alexandre, Diogo Valente, Elmer e João Coentro por toda a amizade, ajuda, apoio e disponibilidade.

À minha família, em especial aos meus pais e avós por toda a sua paciência e apoio que me prestaram.

Aos meus colegas de mestrado, Biologia e também aos amigos de Condeixa e Coimbra, pela simpatia, amizade e bons momentos de descontração.

Agradeço também aos colegas e funcionários do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, especialmente à Sandra Correia, Mariana Neves, Dona Célia, Daniela e Ana, e também da Algoteca de Coimbra, por toda ajuda e disponibilidade que revelaram.

# Índice

<b>RESUMO</b> .....	VI
<b>ABSTRACT</b> .....	VII
<b>1. Introdução</b> .....	1
1.1. Contextualização .....	3
1.2. <i>Acca sellowiana</i> .....	3
1.2.1. Distribuição .....	4
1.2.2. Caracterização .....	5
1.2.3. Interesse económico e investigação .....	7
1.3. Cultura <i>in vitro</i> .....	8
1.3.1. Micropropagação .....	9
1.3.2. Embriogénese somática em plantas lenhosas .....	13
1.3.3. Cultura <i>in vitro</i> de feijoa .....	15
1.3.4. Embriogénese somática em feijoa .....	16
1.3.5. Fatores de stresse e indução de embriogénese somática .....	19
1.4. Objetivos .....	20
<b>2. Materiais e métodos</b> .....	22
2.1. Material vegetal .....	24
2.2. Efeito de fatores de stresse .....	25
2.2.1. Condições de cultura .....	25
2.2.2. Tratamento com microcelulose .....	26
2.2.3. Efeito dos níveis de 2,4-D e sacarose .....	28
2.2.4. Efeito do pH dos meios .....	29
2.2.5. Efeito do stresse oxidativo .....	29
2.2.6. Tratamento com NaCl .....	30
2.3. Análise fenotípica .....	30
2.5. Análise estatística .....	30
<b>3. Resultados</b> .....	31
3.1. Efeito de fatores de stresse .....	33
3.1.1. Tratamento com microcelulose .....	33
3.1.2. Efeito dos níveis de 2,4-D e sacarose .....	37
3.1.3. Efeito do pH dos meios .....	40
3.1.4. Efeito do stresse oxidativo .....	42
3.1.5. Tratamento com NaCl .....	45
3.2. Análise fenotípica .....	45
<b>4. Discussão</b> .....	48
4.1. Efeito de fatores de stresse .....	50

4.1.1.	Tratamento com microcelulose .....	50
4.1.2.	Efeito dos níveis de 2,4-D e sacarose .....	52
4.1.3.	Efeito do pH dos meios .....	54
4.1.4.	Efeito do stresse oxidativo.....	56
4.1.5.	Tratamento com NaCl .....	58
4.6.	Análise fenotípica.....	58
5.	<b>Conclusão e perspectivas futuras</b> .....	61
6.	<b>Referências bibliográficas</b> .....	64

## RESUMO

*Acca sellowiana* também conhecida como *Feijoa sellowiana* é uma árvore com potencial para cultivo e comercialização global. O crescente interesse em utilizar a feijoa para consumo é causado pelo sabor e aromas atrativos do fruto e também nos possíveis benefícios para a saúde, sendo essas as razões para qual esta espécie seja foco crescente de cultivo e investigação. Como em outras espécies lenhosas, estabelecer uma propagação eficaz de clones a partir genótipos com melhores características é um passo importante na exploração comercial desta espécie. Há mais de duas décadas que o potencial de regeneração e de embriogênese somática em feijoa é estudado. Contudo, como se trata de uma planta lenhosa, existem fatores que limitam a eficiência da embriogênese somática nesta planta, especialmente anomalias causadas por uma exposição prolongada a 2,4-D. Muitos dos estudos feitos em feijoa focaram-se apenas na análise do efeito de combinações de diferentes PGR, meios de cultura, tipos de explante e outros compostos orgânicos na indução e desenvolvimento dos embriões somáticos. No entanto, existem fatores de stresse que revelaram induzir (sem o uso de PGR) ou melhorar a expressão de embriogênese em trabalhos feitos noutras espécies. Por isso, no presente trabalho, foi objetivo testar o efeito de alguns fatores de stresse na embriogênese somática de feijoa. Os fatores testados foram: lesões nos explantes (tratamento com microcelulose); efeitos dos níveis de 2,4-D e sacarose; pH dos meios; choques de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (efeito do stresse oxidativo) e tratamentos com NaCl. A embriogênese somática apenas foi induzida em meios com 2,4-D e a maioria dos fatores de stress aplicados não causaram diferenças entre os tratamentos. Adicionalmente, todos os explantes senesceram nos tratamentos com NaCl. Concluiu-se que as metodologias aplicadas não foram eficazes e a forma como os fatores de stresse foram aplicados não melhorava a embriogênese somática em feijoa.

**Palavras-chave:** Feijoa; Embriogênese somática; Stresse; Anomalias; Planta lenhosa

## ABSTRACT

*Acca sellowiana* also known as *Feijoa sellowiana* is a fruit tree with potential for cultivation and global commercialization. The growing interest in using feijoa for consumption is caused by the attractive taste and aromas of the fruit and the possible health benefits, these being the reasons for which this species is a growing focus of cultivation and research. As in other woody plants, establishing effective clonal propagation from genotypes with better characteristics is an important step in the commercial exploitation of this species. The potential for regeneration and somatic embryogenesis in feijoa has been studied for over two decades. However, as it is a woody plant, there are factors that limit the efficiency of somatic embryogenesis in this plant, especially abnormalities caused by prolonged exposure to 2,4-D. Many of the studies done in feijoa, have focused only on analyzing the effect of combinations of different PGR, culture media, explant types and other organic compounds on the induction and development of somatic embryos. Though, there are stress factors that have been shown to induce (without the use of PGR) or enhance the expression of somatic embryogenesis in studies performed in other species. Therefore, in the present work, it was aimed to test the effect of some stress factors on somatic embryogenesis of feijoa. The factors tested were explant wounding (microcellulose treatment); effects of 2,4-D and sucrose levels; pH of the media; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> shocks (oxidative stress) and NaCl treatments. Somatic embryogenesis was only induced in media with 2,4-D and most of the stress factors applied did not cause differences between treatments. Additionally, all explants senesced in the treatments with NaCl. It was concluded that the methodologies applied were not effective and the way stress factors were applied did not enhance somatic embryogenesis in feijoa.

**Keywords:** Feijoa; Somatic embryogenesis; Stress; Anomalies; Woody plant



# 1. Introdução

---





## 1.1. Contextualização

A embriogénese somática é uma poderosa ferramenta de clonagem de plantas bem como um excelente modelo para estudar o desenvolvimento embrionário em plantas, uma vez que durante a embriogénese zigótica o embrião está rodeado por muitos tecidos pertencentes ao óvulo e ovário, o que dificulta o seu isolamento. Para além disso, por norma, num óvulo forma-se apenas um único embrião. Também, em muitas espécies cada ovário possui um único óvulo. A embriogénese somática, permitindo a obtenção de um grande número de embriões a partir de um único explante, cultivado num meio sintético, em condições controladas, permite ultrapassar estas limitações. No laboratório de Biotecnologia de Plantas do Centro de Ecologia Funcional da Universidade de Coimbra, têm sido utilizadas várias espécies lenhosas para caracterizar o processo de regeneração de plantas por embriogénese somática. Entre essas espécies encontra-se a feijoa, uma espécie fruteira originária do Brasil na qual a embriogénese somática foi induzida inicialmente pelo nosso grupo de investigação. Este trabalho representa mais uma contribuição para o estudo da embriogénese somática em plantas lenhosas e, mais concretamente, nesta mirtácea de considerável interesse económico e ecológico.

## 1.2. *Acca sellowiana*

*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret (sinónimo *Feijoa sellowiana*), mais conhecida por goiaba-serrana, goiaba do campo ou feijoa foi colhida pela primeira vez por Friedrich Sellow, explorador alemão, no sul do Brasil em 1815 (Sharpe et al. 1994; Schotsmans et al. 2011). Em 1856, esta foi descrita e identificada como *Orthostemon sellowianus* por Otto Berg. O nome foi posteriormente alterado para *Feijoa sellowiana* em homenagem a João da Silva Feijó, Diretor do Museu de História Natural de São Sebastião, Brasil (Canhoto and Cruz 1996a; Mitra et al. 2012). Na década de 40 do século passado, a designação do género foi substituída para *Acca*, devido às grandes semelhanças que a estrutura da flor e semente da feijoa apresentam relativamente às outras duas espécies desse mesmo género, *A. lanuginosa* e *A. macrostema* (Ruiz & Pav. ex G.Don) Mc Vaugh (Mitra et al. 2012; Pereira 2016).

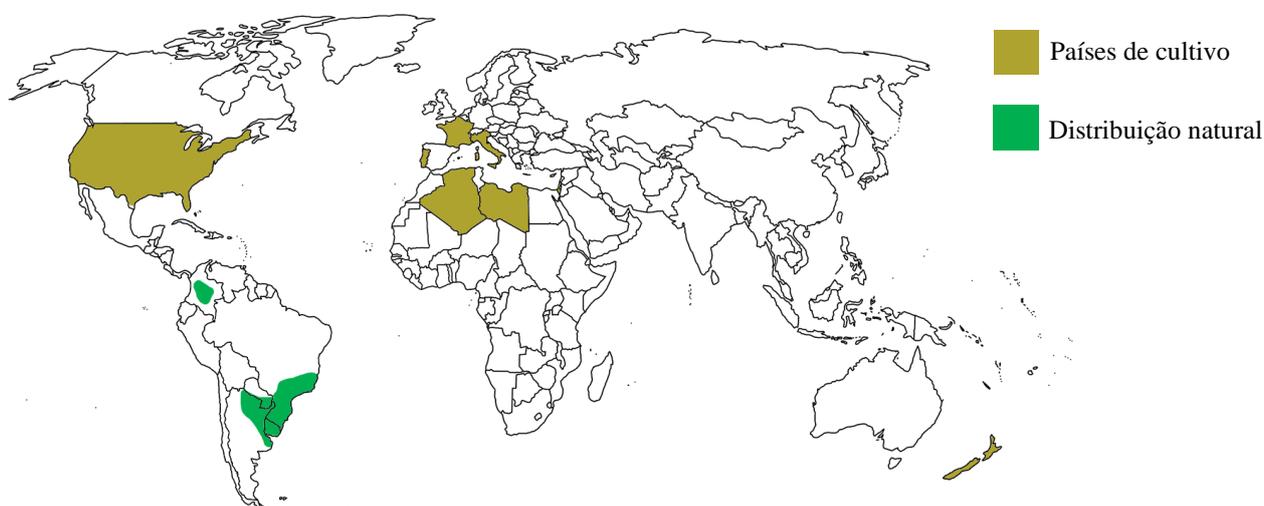
A feijoa é uma Angiospérmica, pertencente ao grupo das Magnoliopsida (Dicotiledóneas). Está incluída na família Myrtaceae, sendo esta família caracterizada por

possuir espécies arbóreas e arbustivas de importância econômica e ecológica, como por exemplo o cravo-da-Índia [*Syzygium aromaticum* (L.) Merrill & Perry] e os eucaliptos (*Eucalyptus* L'Hér.) (Mitra et al. 2012).

### 1.2.1. Distribuição

A feijoa é originária da América do Sul (Figura 1). Esta espécie está distribuída principalmente nas zonas de maior altitude do sul do Brasil, Uruguai, sul do Paraguai, norte da Argentina e ocasionalmente em algumas regiões da Colômbia. Atualmente é cultivada nos terrenos de maior altitude no Chile e outros países sul americanos (Canhoto and Cruz 1996a; Lim 2012; Pereira 2016).

Externamente ao continente sul americano, a feijoa foi introduzida na Europa pelo naturalista francês Edouard André (Schotsmans et al. 2011). Inicialmente introduzida em França, esta espécie foi posteriormente dispersa para outros países europeus e para a América do Norte, que depois levou à sua dispersão para a Austrália e Nova Zelândia (Canhoto and Cruz 1996a; Lim 2012).



**Figura 1.** Mapa da distribuição nativa e países onde a feijoa é cultivada..

Atualmente, a feijoa é utilizada como planta ornamental em muitas nações, sendo também usada para a produção e exportação de frutos. Fora da América do Sul, o cultivo desta espécie é feito em Portugal, sul de França, sul de Itália, Israel, Argélia, Líbia e Nova Zelândia.

Na Nova Zelândia, Colômbia e Brasil várias explorações agrícolas dedicam-se à produção deste fruto , que pode atingir valores consideráveis (10 – 15€ em função da altura do ano nos mercados europeus (Canhoto and Cruz 1996a; Lim 2012).

### 1.2.2. Caracterização

A feijoa é um arbusto ou uma pequena árvore de folha persistente, crescendo naturalmente até uma altura de 4 a 6 metros. Apresenta um tronco lenhificado cilíndrico com uma coloração cinzento-acastanhado, exibindo vários ramos criando uma copa redonda irregular. O sistema radicular é fibroso e superficial. As suas folhas são espessas, curtas e pecioladas com um formato elíptico, dispendo-se de forma oposta e exibindo uma coloração verde-escuro brilhante (Schotsmans et al. 2011; Amarante and Santos 2011).

As populações nativas de feijoa apresentam diferenças fenotípicas significativas, tendo sido identificadas 2 populações distintas. As populações que se encontram nas regiões de maior altitude do planalto de basalto do sudeste brasileiro apresentam sementes grandes e uma polpa dura e amarga no fruto. As populações encontradas nos solos ácidos do Uruguai e a sul do estado do Rio Grande do Sul no Brasil caracterizam-se por um fruto com sementes pequenas e uma polpa doce, fofa e succulenta (Schotsmans et al. 2011; Lim 2012; Pereira 2016). Foi esta última variante do fruto, aquele que foi disperso para o resto de mundo e é atualmente comercializado e exportado globalmente (Schotsmans et al. 2011).

Esta espécie não é muito exigente no que diz respeito ao tipo de solo (Canhoto and Cruz 1996a; Schotsmans et al. 2011). Consegue tolerar diversas condições de solo, proliferando com relativa facilidade nos solos acídicos nativos, já mencionados, ou em solos com pobre drenagem. Além disso, também consegue sobreviver em temperaturas baixas, até -10°C. No entanto, em sistemas de cultura a melhor produtividade e desenvolvimento desta planta são obtidos em solos de argila arenosa ligeiramente ácidos bem drenados e em climas temperados ou subtropicais (Canhoto and Cruz 1996a; Schotsmans et al. 2011).

A primeira floração ocorre geralmente entre os 3 a 5 anos após a germinação, durante a primavera (Dettori and Gaetano 1991; Canhoto and Cruz 1996a). As suas flores são hermafroditas, apresentando o ovário numa posição ínfera. Cada flor exhibe vários estames de coloração vermelho vivo e um carpelo com apenas um estilete e um estigma, rodeados por 4 a 6 pétalas succulentas comestíveis com a página inferior de cor branca e a página superior de cor vermelha ou rosa (Ramírez and Kallarackal 2017). Como a flor não produz néctar não é muito

atrativa para insetos polinizadores, como abelhas (Dettori and Gaetano 1991; Ramírez and Kallarackal 2017). Adicionalmente, a polinização por parte destas é pouco efetiva (Stewart and Craig 1989; Dettori and Gaetano 1991). Assim, a polinização está dependente de aves, sendo estas atraídas pelas cores vivas das flores, alimentando-se das pétalas suculentas (Schotsmans et al. 2011).

O fruto da feijoa (Figura 2) amadurece durante o outono. É uma baga de forma ovoide ou arredondada, podendo ter um comprimento de 5cm a 13cm de por um diâmetro de 2.5cm a 6cm, exibindo parte do cálice da antiga flor na ponta. Possui uma casca verde que apresenta uma textura lisa ou rugosa com uma espessura variável (Amarante and Santos 2011). Esta envolve uma polpa grossa suculenta, branca granulosa, que por sua vez rodeia as sementes numa polpa translúcida (Schotsmans et al. 2011; Lim 2012; Pereira 2016). O fruto exibe um grande número de sementes, entre 20 a 80, de forma alongada e de pequenas dimensões. É muito aromático e demonstra um sabor único semelhante a outros frutos doces subtropicais, como ananás ou goiaba.



**Figura 2.** Aspeto dos frutos da feijoa. Frutos imaturos, em que se pode observar o estilete (a); Fruto maduro (b); Um fruto cortado transversalmente onde são visíveis várias sementes e os 5 lóculos típicos desta espécie (c).

### 1.2.3. Interesse económico e investigação

Os focos principais de investigação e investimento económico nesta espécie, estão no fruto e nos compostos aromáticos que a árvore produz, quer nas folhas quer nos frutos . O crescente interesse em utilizar a feijoa para consumo é causado pelo sabor e aromas atrativos do fruto e também nos possíveis benefícios para a saúde (Zhu 2018).

O fruto da feijoa é muito versátil, podendo ser consumido de diversas formas. Apesar de ser normalmente consumido fresco, a feijoa pode ser cristalizada e desidratada, para além de se poderem confeccionar outros produtos alimentares, como geleias, tartes, bebidas, gelados, bolos e chocolates (Zhu 2018). Existem também produtos comercializados aromatizados com sabor a feijoa. Em termos nutricionais, apresenta um baixo valor calórico, grandes concentrações de vitamina C e iodo, fibra, potássio, fósforo, magnésio e cálcio (Weston 2010). Possui também uma série de diferentes polifenóis, lípidos e óleos essenciais. Várias destas substâncias exibem propriedades antioxidantes, anticancerígenas e um forte potencial antibacteriano e antifúngico (Weston 2010; Lim 2012; Pereira 2016). Relativamente a frutos que também apresentam tais propriedades (e.g. ameixa, morango, mangostão) os frutos de feijoa parecem demonstrar uma potência superior, evidenciando o inerente potencial desta espécie (Nasef et al. 2014). No entanto, estudos sobre as propriedades químicas e biológicas da feijoa ainda não foram muito explorados (Harman 1987; Zhu 2018).

Como já foi anteriormente mencionado, vários países produzem e comercializam frutos de feijoa. Por exemplo, a Nova Zelândia é o maior produtor e exportador deste fruto, tendo também desenvolvido cultivares de maior qualidade e tamanho do fruto (Schotsmans et al. 2011; Amarante and Santos 2011). Outros países que cultivam esta espécie têm feito estudos para permitir o posterior desenvolvimento de cultivares mais produtivos com frutos de tamanho homogéneo, menor textura granulosa e um tempo de armazenamento superior (Schotsmans et al. 2011). Contudo, a feijoa continua a ser uma espécie pouco utilizada relativamente a outros frutos, como por exemplo, laranjas ou maçãs (Mitra et al. 2012; Zhu 2018). A diversidade genética desta espécie ainda não é utilizada em toda a sua extensão para o seu melhoramento e vários produtos comercializados à base desta fruta estão associados a apenas alguns nichos de mercado (Zhu 2018).

Para além do fruto, outros órgãos da feijoa têm demonstrado utilidade alimentar e medicinal. As folhas, por exemplo, podem ser utilizadas em infusões e as pétalas, como são

comestíveis e apresentam um aroma agradável, podem ser utilizadas como acompanhamento nas refeições ou como decorações de pratos (Schotsmans et al. 2011; Lim 2012; Pereira 2016).

No seu ecossistema natural, e também nos locais onde é cultivada a feijoa é utilizada na alimentação de aves. Por exemplo, os melros, utilizam com frequência as pétalas no seu regime alimentar, contribuindo igualmente para a polinização (Sazima and Sazima 2007). Nas suas zonas nativas, o interesse desta espécie está adicionalmente associado às populações naturais ameaçadas pela expansão da fruticultura e pecuária, que coloca em risco a diversidade genética e podendo causar a eventual extinção de alelos raros. A manutenção dos indivíduos nas zonas de ocorrência nativa contribui para a conservação desta espécie e consequentemente de alelos raros, cuja investigação poderá vir desvendar características com potencial económico para uma maior eficácia na produção do fruto ou para substâncias com potencial medicinal (Pereira 2016).

### **1.3. Cultura *in vitro***

A cultura *in vitro* de plantas é uma metodologia que permite o estabelecimento e manutenção, em condições laboratoriais, de tecidos, órgãos, células vegetais ou massas de células indiferenciadas (calos) (George et al. 2007; Bhatia et al. 2015). A sua utilização permite a obtenção de um elevado número de plantas num curto espaço de tempo, a partir de um explante (material vegetal colocado em cultura) de pequenas dimensões e a propagação de espécies difíceis de clonar por técnicas convencionais ou a regeneração de indivíduos geneticamente modificados a partir de um pequeno número de células (Bonga and Durzan 1982; George et al. 2007). Para além da clonagem de plantas e transformação genética, a cultura *in vitro* também é utilizada para a produção de metabolitos secundários, fusão de protoplastos e obtenção de plantas haploides (Canhoto 2010).

Para fins de investigação, a cultura *in vitro* destaca-se por ser um meio para abordar diversos processos de desenvolvimento, crescimento e morfogénese vegetal em condições laboratoriais controladas (George et al. 2007). Desvendando novos conhecimentos no estudo e compreensão dos mecanismos moleculares, fisiológicos e bioquímicos envolvidos no desenvolvimento dos diferentes tecidos e órgãos das plantas (Bhatia et al. 2015).

Um dos aspetos de maior importância na cultura de plantas em condições laboratoriais é a preparação de um meio de cultura adequado para o tipo de experiência e espécie em questão (Schenk and Hildebrandt 1972; Sudheer et al. 2022). O meio de cultura pode ser líquido ou

gelificado (Bonga and Durzan 1987; Bhatia et al. 2015). Neste último, pode-se utilizar agar para solidificar o meio. Outras substâncias têm de ser adicionadas e certas condições têm de ser preservadas com o propósito de permitir a manutenção e/ou o crescimento do material vegetal, dificultando também a contaminação do meio com outros seres vivos, como fungos e bactérias através da esterilização dos componentes do ensaio experimental (Schenk and Hildebrandt 1972; Lambardi et al. 2013; Hassan and Zayed 2018).

Os nutrientes necessários para o metabolismo e desenvolvimento das células dum explante podem ser categorizados consoante a quantidade que o explante os utiliza. Assim, pode-se separar os nutrientes utilizados num meio de cultura em dois grupos, macronutrientes e micronutrientes (George et al. 2007). Compostos de carbono, oxigénio, azoto, fósforo, cálcio, enxofre e magnésio são considerados macronutrientes, pois as plantas utilizam estes elementos para a estruturação das suas células, produção de energia, construção de proteínas entre outros (Canhoto 2010). Elementos inorgânicos, como o ferro, zinco, manganésio e cobre são necessários como cofatores de enzimas e ativadores de vias metabólicas. Apesar da sua indispensabilidade apenas são necessárias pequenas quantidades, logo são considerados micronutrientes. Adicionalmente também são usados compostos orgânicos como vitaminas, aminoácidos e glícidos (George et al. 2007). Estes últimos alimentam o tecido vegetal em crescimento, enquanto este se encontra numa fase heterotrófica (Bhatia et al. 2015). Dependendo do tipo de ensaio experimental, a concentração destas substâncias anteriores é alterada para permitir uma eficiência máxima na manutenção vegetal. Atualmente, um dos meios mais utilizados é o meio MS, inicialmente utilizado em plantas do tabaco (Murashige and Skoog 1962; Canhoto et al. 1999a; Akhtar 2010; Canhoto 2010; Youssef et al. 2010).

Com o objetivo de induzir certas respostas de desenvolvimento no tecido vegetal também são adicionados reguladores de crescimento (PGR) ao meio de cultura, por exemplo hormonas vegetais. As auxinas, por exemplo, são utilizadas para a formação e manutenção de calos, formação de raízes adventícias, formação de embriões somáticos e indução de meristemas caulinares adventícios (Canhoto 2010). Estes processos descritos são alguns dos utilizados na micropropagação de plantas.

### 1.3.1. Micropropagação

Dos diferentes protocolos utilizados na cultura *in vitro* de plantas, o processo associado à clonagem de plantas é designado por micropropagação. Este método permite a regeneração e

multiplicação de um grande número de indivíduos a partir de material orgânico de dimensões reduzidas, como já foi referido anteriormente (Bhatia and Sharma 2015). Nesta técnica, a produção de plantas em grande escala num curto intervalo de tempo rivaliza e supera os resultados obtidos através de outros métodos mais tradicionais (Hammatt 1992; George et al. 2007; Canhoto 2010).

A micropropagação de plantas pode dividir-se em três tipos principais diferentes. Esta separação dos métodos de micropropagação depende do tipo de material inicial utilizado e o tipo de resposta obtida (George et al. 2007). Assim, a micropropagação é dividida em proliferação de meristemas caulinares, indução de organogénese e embriogénese somática (Bhatia and Bera 2015; Bhatia and Sharma 2015; Kumlay and Ercisli 2015; Hassan and Zayed 2018).

A micropropagação através da proliferação de meristemas caulinares é o tipo mais simples e de realização mais fácil, pois apenas requer o desenvolvimento dos meristemas caulinares já presentes no corpo da planta (Lane 1979; Prammanee et al. 2011). Apesar da presença de diferentes tipos de meristemas no caule e na raiz, os meristemas mais utilizados para a regeneração e clonagem de plantas são os meristemas axilares do caule e o meristema apical do caule (SAM). Apesar da aparente simplicidade deste processo, a utilização e a manutenção cuidada de hormonas vegetais é essencial, para evitar deficiências no crescimento vegetal e a formação de calos (Ikeuchi et al. 2013). As citocininas, por exemplo, são importantes na fase de propagação pois promovem a quebra de dominância apical e estimulam o desenvolvimento dos meristemas axilares (Hassan and Zayed 2018). As auxinas são necessárias na fase de enraizamento para promoverem a formação de raízes adventícias (George et al. 2007). Algumas limitações desta técnica são a formação de folhas translúcidas, a vitrificação das folhas e a dificuldade de clonar planta lenhosas (Bonga and Durzan 1982; Canhoto 2010; Corredoira et al. 2019).

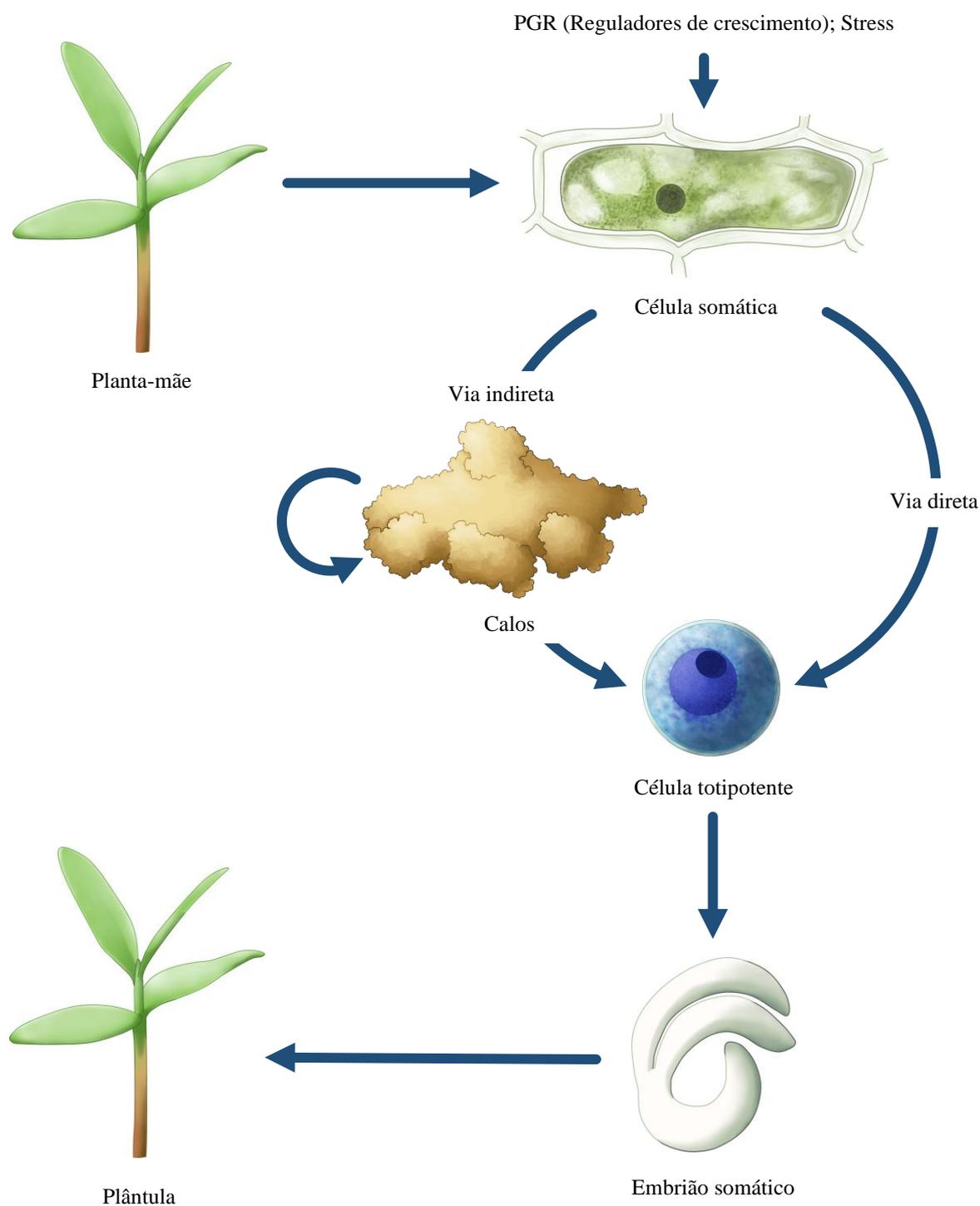
Na indução de organogénese, o explante é estimulado a produzir uma estrutura unipolar, principalmente primórdios caulinares ou radiculares (Bhatia and Bera 2015; Sang et al. 2018; Bidabadi and Mohan Jain 2020). Ao contrário da técnica anterior, cujo explante apresentava meristemas, na organogénese há a indução de novos meristemas no explante, denominados de meristemas de neoformação ou adventícios (Canhoto and Gruz 2000; Bidabadi and Mohan Jain 2020). A organogénese permite também a produção de raízes adventícias, flores, tubérculos e bolbos (Bidabadi and Mohan Jain 2020). A organogénese pode ser dividida em direta e indireta (Bhatia and Bera 2015; Sang et al. 2018). Nesta primeira, as células do explante diferenciam-se em meristemas caulinares formando de seguida rebentos caulinares. Na indireta, há

inicialmente a formação de um calo, em que, só depois há o aparecimento de rebentos caulinares. A razão entre auxinas e citocininas é determinante no tipo de resposta da organogénese (Canhoto 2010).

Finalmente, na embriogénese somática (Figura 3), o explante é induzido a formar estruturas bipolares, ou seja, estruturas com um polo caulinar e um polo radicular (Mordhorst et al. 1997). Neste caso, as células do explante multiplicam-se e organizam-se numa estrutura semelhante ao embrião zigótico (Von Arnold et al. 2002; Quiroz-Figueroa et al. 2006). Estes embriões são denominados de somáticos, pois apresentam semelhanças fisiológicas aos embriões zigóticos e originam-se a partir do corpo (*soma*) da planta (Cangahuala-Inocente et al. 2004a). Ao contrário dos embriões zigóticos, os embriões somáticos apresentam um genoma idêntico ao da planta mãe e podem ter uma origem unicelular ou multicelular (Fehér 2019). A embriogénese é composta por quatro fases: indução, desenvolvimento (dos embriões somáticos), germinação e aclimatização (Komamine et al. 1992). São utilizadas diversas condições para promover a indução de embriogénese, como por exemplo, a presença de auxinas no meio, condições de stresse, a adição de hidratos de carbono ou de cálcio (Dudits et al. 1995; Guerra et al. 2001; Hofmann et al. 2004; Gulzar et al. 2020; Prudente et al. 2020). No entanto, nem todas as condições enumeradas anteriormente resultam para o mesmo genoma (Cassells and Curry 2001). De facto, o tipo de genoma é também uma condição importante no tipo de resposta do explante. A embriogénese somática apresenta também diferentes tipos, dependendo da resposta do explante. Esta pode ser direta, indireta, através da formação e manutenção de calos embriogénicos ou repetitiva (Baker and Wetzstein 1994; Rahayu et al. 2016; Boldaji et al. 2021). Nesta metodologia, a direta e a indireta são semelhantes às da organogénese, ou seja, na direta o explante forma diretamente a nova estrutura, enquanto na indireta o explante desenvolve inicialmente calos e só depois desenvolve a nova estrutura (Canhoto 2010).

As plantas, relativamente aos animais, apresentam um pequeno número de órgãos e de tipos celulares (Nelson et al. 2008). Para além disso, vários destes tipos celulares não exibem um grande grau de diferenciação, em comparação com as células meristemáticas que lhes deram origem, quando comparando às diferenças entre uma célula estaminal e outra diferenciada num animal (Nelson et al. 2008; Canhoto 2010). De facto, estas características podem ser a razão por detrás da fácil capacidade de desdiferenciação das células vegetais, em que, uma célula diferenciada pode voltar a adquirir totipotência (Dudits et al. 1995; Von Arnold et al. 2002; Karami et al. 2009). Apesar deste facto, esta capacidade é diferente de espécie para espécie. Assim diferentes espécies reagem de diferentes formas aos tipos de micropropagação

anteriormente mencionados (Dunstan et al. 1995). Havendo metodologias com certos procedimentos que exibem maior sucesso em certas espécies.



**Figura 3.** Síntese esquemática da embriogênese somática. Aplicação de PGR ou fatores de stresse em células somáticas induz a desdiferenciação e aquisição de totipotência diretamente ou por uma fase intermédia de formação de calos. As células totipotentes desenvolvem-se para embriões somáticos que depois dão origem a um clone da planta-mãe.

### 1.3.2. Embriogénese somática em plantas lenhosas

Plantas lenhosas são um grupo grande e variado de espécies de grande importância económica, fornecendo recursos importantes como madeira, que depois pode ser transformada noutros produtos, como por exemplo papel. Outras espécies são utilizadas na produção agrícola, para a obtenção de vários tipos de frutos ou também podem ser usadas como plantas ornamentais e decorativas. Estabelecer uma propagação eficaz de clones a partir genótipos superiores (elite) é um passo importante na exploração comercial deste grupo heterogéneo de espécies. Apesar da aplicação de certas técnicas de seleção genómica em programas longos e dispendiosos de seleção de características desejáveis, o uso de embriogénese somática para a clonagem de plantas com genomas interessantes continua a ser vista como a metodologia mais eficaz (Hammatt 1992; Vieitez et al. 2012; Pais 2019). A indução de embriões somáticos permite uma multiplicação mais rápida e superior e também a criação de plantas geneticamente modificadas. Contudo, não existem protocolos generalistas para a propagação de clones para muitas das espécies a uma escala comercial (Corredoira et al. 2019). Apesar dos vários esforços e estudos de embriogénese somática em plantas lenhosas, a informação e resultados obtidos estão apenas ligados a um genótipo sendo, em certos casos, difícil noutros genótipos ou em espécies aparentadas (Hammatt 1992; Vieitez et al. 2012; Correia et al. 2016).

Nos protocolos atuais, as limitações de informação dificultam a aplicação de metodologias de embriogénese nas quatro fases deste processo, já mencionadas anteriormente (Ross et al. 2017; Pais 2019). As condições específicas para a indução inicial de embriogénese em plantas lenhosas são muitas das vezes únicas para cada espécie mostrando a complexidade deste passo inicial (Vieitez et al. 2012; Ballester et al. 2016; Corredoira et al. 2019). Variáveis como o tipo de explante, meio de cultura, tipo de PGR, fatores epigenéticos e genótipo apresentam um papel importante no processo de indução. Adicionalmente, a taxa de iniciação de embriogénese é uma característica hereditária o que permite a seleção de genomas de interesse em plantas com uma indução de embriogénese eficaz (Corredoira et al. 2019). Por outro lado, os PGR mostraram ter uma maior influência na embriogénese do que o tipo de meio de cultura. Dentro dos PGR, as auxinas e citocininas são compostos chave para a indução, mas a ação destas hormonas varia consoante a espécie e explante em estudo (Pinto et al. 2008; Hassan and Zayed 2018). A indução de embriões somáticos num meio sem PGR também é possível, principalmente usando embriões zigóticos imaturos de algumas espécies (Corredoira

et al. 2019). Contudo, a exposição contínua de concentrações elevadas de auxinas ou citocininas nos explantes pode resultar na formação de embriões anómalos e não funcionais (Canhoto et al. 1999b, 2009; Garcia et al. 2019). Na maioria das espécies estudadas, independentemente do tipo explante, o processo de embriogênese somática ocorre num procedimento de dois passos, em que cada passo apresenta pelo menos um tipo de meio diferente (meio para indução e o meio para desenvolvimento dos embriões) (Corredoira et al. 2019).

Em algumas plantas lenhosas, embriões zigóticos são o tipo de explante no qual a indução de embriogênese é mais facilmente conseguida. Embriões imaturos geralmente demonstram maior potencial embriogénico, comparativamente aos maduro (Correia et al. 2016)s. Apesar da embriogênese somática ser mais fácil usando embriões como explante, a desvantagem é que o material propagado tem um valor genético desconhecido. Outros explantes usados incluem, o uso de tecido maternais, como tegumentos ou embriões adventícios, tecidos florais, tecidos radiculares, tecidos merismáticos e foliares (Long et al. 1995; Stefanello et al. 2005). O uso de tecidos maternais e florais dá a vantagem de que a árvore em questão já expressa o fenótipo maduro, contudo a dependência destes explantes para a clonagem implica que se tem de esperar pela produção destes tecidos, o que dependendo da espécie, pode demorar várias décadas (Corredoira et al. 2019).

A germinação dos embriões somáticos é atualmente um fator limitante na regeneração de várias plantas lenhosas. As baixas percentagens de germinação estão frequentemente associadas à baixa qualidade dos embriões e à falta de condições adequadas de maturação e tolerância à dessecação (Kamle and Baek 2017; Garcia et al. 2019). A maturação dos embriões somáticos, como ocorre nos zigóticos, é caracterizada pela acumulação de substâncias de reserva, obtenção de tolerância à seca e preparação para dormência (Cangahuala-Inocente et al. 2004b). Os protocolos para maturação tentam simular as condições fornecidas pela planta-mãe durante a maturação dos embriões zigóticos (Correia et al. 2016). Os meios de cultura para maturação de embriões somáticos costumam ser suplementados com ácido abscísico (ABA) ou apresentam uma osmolaridade elevada. Esta última causa a redução do volume de água nas células dos embriões e induz a síntese de substâncias de reserva (Martínez et al. 2019). Ainda não existem bons indicadores para avaliar o nível de maturação antes de induzir a germinação destes. Assim, os efeitos dos tratamentos podem apenas ser avaliados após a germinação. Nos embriões somáticos de várias plantas lenhosas, os tratamentos para maturação e germinação não favorecem o desenvolvimento de meristema apical com estrutura normal, complicando a germinação (Youssef et al. 2010; Pais 2019). Muitas das vezes são adicionados inibidores de

etileno e PGR, como ácido giberélico ou citocininas, ao meio de cultura para melhorar a estrutura do meristema apical e estimular desenvolvimento completo (Jiménez 2005).

Na maioria das espécies, um período de aclimatização é necessário para aumentar as chances de sobrevivência de plântulas regeneradas de condições de cultura *in vitro* na transferência para condições de crescimento *ex vitro* (Dunstan et al. 1995; Stefenon et al. 2020). As plântulas têm geralmente um vigor baixo como resultado de terem crescido em condições de stresse, incluindo alta humidade, baixa luminosidade, temperatura estável constante, crescimento heterotrófico e condições de cultura estéreis (Fraga et al. 2013). Após a transferência para o campo, as plântulas precisam de um intervalo de tempo para se adaptar às novas condições. Um problema que resulta da regeneração de plantas por cultura *in vitro* é a variação somaclonal (Bidabadi and Mohan Jain 2020). Caracteriza-se pelo aparecimento de variações hereditárias indesejáveis nos embriões somáticos, pois estes devem ser idênticos à planta original. A conformidade genética das plantas regeneradas é principalmente avaliada aos níveis morfológicos, citológicos, bioquímicos e moleculares e os variantes somaclonais são usualmente detetados usando marcadores morfológicos (Corredoira et al. 2019).

### 1.3.3. Cultura *in vitro* de feijoa

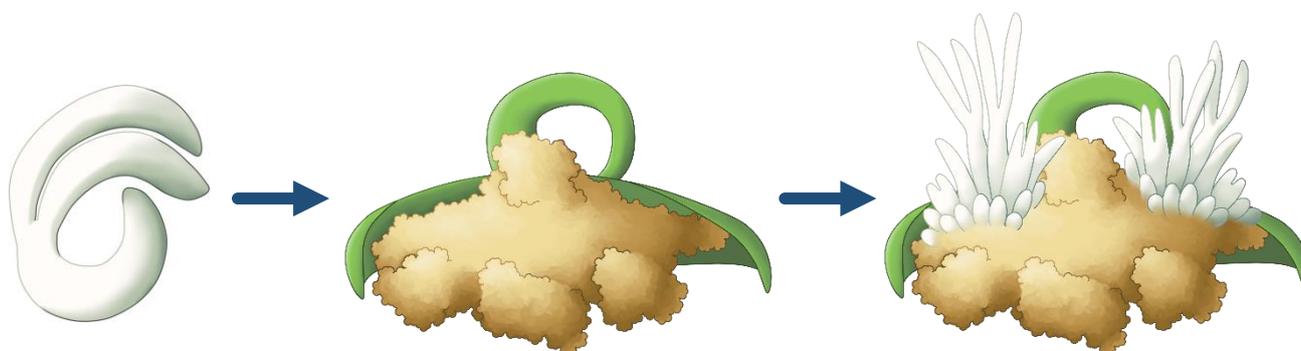
O crescente potencial da feijoa como planta de cultivo e de produção de frutos levou a um gradual interesse em técnicas de clonagem e multiplicação vegetativa com o objetivo de fixar genótipos de interesse e promover uma rápida multiplicação de indivíduos. Através de métodos convencionais, a propagação de *A. sellowiana* apresenta algumas desvantagens relativamente ao potencial que a cultura *in vitro* desta espécie pode exibir. A utilização de sementes não permite fixar genótipos com características desejáveis e a sua viabilidade decresce rapidamente num curto intervalo de tempo, dificultando a sua conservação. Para além disso, a clonagem por estacaria demonstra ser um processo complicado, devido ao difícil enraizamento do material vegetal e a enxertia é ineficaz, especialmente em plantas adultas, devido à sua fraca capacidade regenerativa e à grande produção de compostos fenólicos. Assim, desde o início da década de 80, diversos estudos e ensaios experimentais foram executados na *A. sellowiana* utilizando as técnicas de micropropagação previamente caracterizadas.

Os primeiros trabalhos experimentais (Bhojwani et al. 1987; Oltramari et al. 2000) foram executados usando as técnicas de proliferação de meristemas e organogénese. Nesses estudos, foram usados diferentes tecidos jovens com células meristemáticas como explantes em

diferentes combinações de meios de cultura com o objetivo de promover o desenvolvimento dos meristemas ou de outros tecidos. Contudo, uma das principais limitações da clonagem da feijoa é o facto de esta ser uma espécie lenhosa. A capacidade de multiplicação vegetativa das espécies lenhosas e arbóreas decresce exponencialmente na transição para a fase adulta, havendo algumas exceções. Apesar do uso de tecidos jovens ou indiferenciados como explantes, os únicos resultados obtidos foram algum desenvolvimento e perda de dominância apical na presença citocininas. Embora a proliferação de meristemas e a organogénese não tenham sido metodologias que demonstraram usufruir do fraco potencial regenerativo da feijoa, diferentes combinações de hormonas vegetais nos meios de cultura mostraram o potencial da cinetina e da BA na organogénese e proliferação de meristemas.

#### 1.3.4. Embriogénese somática em feijoa

A embriogénese somática foi obtida pela primeira vez na feijoa na década de 90 (Cruz et al. 1990). Os explantes utilizados nos primeiros estudos foram embriões zigóticos inoculados em meios MS com diferentes auxinas [ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D); ácido 3-indolbutírico (IBA); ácido 1-naftaleneacético (NAA)]. Apesar da presença de anomalias nos embriões somáticos, como ausência de cotilédones ou hipocótilos fundidos, a embriogénese somática na feijoa demonstrou superar os resultados das outras metodologias de micropropagação (Figura 4). Para além disso, a indução de embriões somáticos em feijoa mostrou ser assíncrona, ou seja, no mesmo explante aparecem embriões somáticos a diferentes pontos temporais, podendo-se encontrar esses mesmos durante as várias fases de desenvolvimento embriogénico (Canhoto and Cruz 1996a).



**Figura 4.** Síntese esquemática do processo de embriogénese somática em feijoa. Um embrião zigótico germina e desenvolve inicialmente calos antes da indução de embriões somáticos.

A presença de auxinas no meio de cultura é determinante (mas não obrigatória) para a indução da embriogênese. O 2,4-D é particularmente eficaz, quando comparado com outros tipos de auxina (Baker and Wetzstein 1994; Rahayu et al. 2016). O uso de diferentes concentrações desta auxina em meio MS revelou que 1mg/L de 2,4-D causa a melhor resposta nos explantes de feijoa (Canhoto et al. 1999b). Contudo, uma exposição prolongada à auxina pode ter consequências negativas, nomeadamente o frequente desenvolvimento de anomalias nos embriões somáticos. Assim, como alternativa podem ser feitos choques auxínicos, diminuindo o tempo de exposição de auxina no explante (Guerra et al. 2001; Pereira 2016). Choques auxínico permitiram a aquisição de competência embriogénica e o desenvolvimento de embriões morfológicamente normais (Guerra et al. 2001; Pereira 2016). Quando usadas concentrações superiores de 2,4-D em intervalos de tempo mais pequenos (1-24h) ocorre também uma diminuição da taxa de indução juntamente com a diminuição do aparecimento de anomalias, dependendo da concentração da auxina e tempo de exposição (Guerra et al. 2001; Canhoto et al. 2009). Adicionalmente a combinação da ação da 2,4-D com hidratos de carbono (sendo a sacarose que demonstrou melhores resultados) revelou promover ainda mais a indução de embriogênese e o aparecimento de um maior número de embriões nos explantes, demonstrando a eficácia superior desta metodologia (Canhoto and Cruz 1996a).

A presença de auxinas não é o único fator que permita a indução de embriogênese. De facto, a adição de compostos azotados ( $\text{NO}_3^-$ ;  $\text{NH}_4^+$ ), levou também à indução de embriogênese, mas a sua ação é diminuta comparada com a ação de hormonas vegetais (Guerra et al. 1997). Por outro lado, a adição de aminoácidos revelou ter uma grande influência sobre a embriogênese somática em feijoa. A adição de glutamina, aspartato e arginina, a um meio de indução melhoram significativamente a indução e desenvolvimento de embriões. A importância e a presença de diferentes aminoácidos pelas várias fases de desenvolvimento embriogénico, sugeriram que a sua adição a culturas de embriogênese somática poderiam influenciar este processo (Dal Vesco and Guerra 2001). A suplementação dum meio de indução com ácido gama-aminobutírico (GABA) também aumentou significativamente a indução de embriões somáticos diminuindo o aparecimento de embriões fundidos e permitindo a ocorrência dum maior número de embriões sem anomalias (Pavei et al. 2018). Glutathione e ácido cafeico são outros exemplos de substâncias acionadas aos meios de cultura que afetam a embriogênese somática. Ambos permitem o aumento da indução, mas o ácido cafeico também melhora o desenvolvimento e germinação, enquanto a glutathione acelera a indução de embriões somáticas e a sincronização do seu desenvolvimento (Reis et al. 2008; Pavei et al. 2018). Finalmente, o

uso de proteínas de arabinogalactano (AGP) resulta também na indução de embriogênese (Pereira 2016).

Os explantes mais utilizados na embriogênese somática em feijoa são embriões zigóticos, no entanto, o uso de certos tecidos florais adultos na presença de Picloram em vez de 2,4-D revelou bons resultados na indução de embriogênese somática, mas dependente do genótipo (Stefanello et al. 2005). Um dos aspectos importantes na utilização de embriões zigóticos como explantes é a fase em que estes se apresentam. A fase cotiledonar (último estágio de embriogênese) é a que produz melhores resultados em condições de meio MS, mas estes resultados revelaram ser opostos num meio LP com vitaminas de Morel em que foram os embriões imaturos que demonstraram uma maior taxa de indução de embriogênese (Guerra et al. 1997). A presença de outras substâncias, mencionadas anteriormente, e diferentes concentrações destas também mostraram induzir respostas diferentes dependendo da fase embriogénica do explante (Reis et al. 2008; Pavei et al. 2018). Para além disso, o tipo de genótipo também é determinante na resposta do explante. Por exemplo, as diferenças entre genótipos foram significativas quando em meio MS com 2,4-D, a concentração de sacarose foi reduzida, demonstrando mais uma vez a importante influência deste composto na regeneração dos explantes e como o meio de cultura pode influenciar respostas diferentes (Cangahuala-Inocente et al. 2004b; Canhoto et al. 2009).

Na fase de germinação, uma combinação de giberelinas e citocininas promove um crescimento mais eficiente dos embriões somáticos, mas o número de plantas regeneradas é baixo considerando o número de embriões somáticos desenvolvidos. Estes resultados podem ser aperfeiçoados, utilizando embriões somáticos numa fase pré-cotiledonar, em que, quase a totalidade dos embriões consegue germinar (Canhoto and Cruz 1996a; Guerra et al. 1997).

Em estudos para identificação e caracterização dos processos histológicos e metabólicos presentes num embrião somático e origem destes, os diversos compostos orgânicos (amido, fenóis, proteínas de reserva) foram corados permitindo entender a evolução do processo embriogénico. Os embriões somáticos apresentam duas origens na feijoa, unicelular e multicelular. Determinou-se que a partir da epiderme dos cotilédones, os embriões somáticos resultam de apenas uma célula e desenvolvem uma estrutura semelhante ao suspensor. Os embriões de origem multicelular desenvolvem-se a partir de mesófilo que está sob a epiderme dos cotilédones, provavelmente de gemulação (Canhoto and Cruz 1996b; Cangahuala-Inocente et al. 2004b).

### 1.3.5. Fatores de stresse e indução de embriogénese somática

Os PGR e os fatores de stresse são dois tipos de fatores de indução que permitem às células diferenciadas desenvolverem-se em células desdiferenciadas sofrerem um processo de desdiferenciação e, eventualmente, tornar-se embriogenicamente competentes (Zavattieri et al. 2010; Karami and Saidi 2010a; Fehér 2015). Fator de stresse pode ser definido como qualquer condição ambiental potencialmente adversa que afeta o crescimento e desenvolvimento vegetal, ativando um conjunto de respostas, desde a alteração da expressão genética e metabolismo celular até à modificação da taxa de crescimento. O stresse é uma das principais causas para a mudança do comportamento somático dum tecido ou célula, para um comportamento embriogénico (Pasternak et al. 2002a; Ikeuchi et al. 2017; Méndez-Hernández et al. 2019). A indução de embriogénese somática é apenas possível quando células somáticas duma planta readquirem a sua totipotência e obtêm a competência necessária para responder aos sinais embriogénicos e iniciar a embriogénese (Santarem et al. 1997; Elmeer 2013; Fehér 2015). Neste contexto, fatores de stresse no geral parecem ser capazes de promover a embriogénese somática nas devidas condições (Rose et al. 2013).

Exemplos de fatores de stresse são: choques osmóticos, desidratação do meio de cultura, aplicação de iões de metais pesados, alterações do pH do meio, tratamentos de choque térmico, hipoxia, antibióticos, radiação ultravioleta e outros tratamentos físicos ou químicos (Pasternak et al. 2002a). Um tipo de tratamento físico é causar lesões nos explantes (Zavattieri et al. 2010). Especificamente, este fator de stresse leva a que as plantas isolem a zona afetada com a formação de calos para prevenir infeções e perda excessiva de água. Além disso, as células destes calos podem sofrer ulterior diferenciação vascular ou organogénese (Zavattieri et al. 2010; Ikeuchi et al. 2017). Calos induzidos a partir de ferimentos têm origem em vários tipos de células e esta formação de células desdiferenciadas, tem a capacidade de regenerar tecidos em lesões locais, substituir órgãos ou até, em casos extremos, regenerar uma planta inteira a partir duma célula através de embriogénese somática (Zavattieri et al. 2010; Elmeer 2013; Fehér 2015; Ikeuchi et al. 2017).

A grande variedade de condições de stresse capazes de indução da embriogénese pode ser parcialmente explicada pela interação que estes têm com os níveis hormonais endógenos dos explantes, que também dependem de outros fatores, como o genótipo, fase de desenvolvimento, idade e vice-versa (Zavattieri et al. 2010). Normalmente, as hormonas

vegetais que induzem embriogênese são auxinas ou combinações de auxinas com citocininas. No entanto, ainda é pouco compreendido como estas fitohormonas interagem com os fatores de stresse para desencadear a cascata de sinais que leva à indução da replicação celular e ulterior embriogênese somática (Rose et al. 2013). Explantes com níveis superiores de auxinas endógenas demonstram maiores taxas de indução de embriões somáticos, em certos casos não precisam da presença de auxina exógena para a indução (Zavattieri et al. 2010). Na cenoura (*Daucus carota*), por exemplo, demonstrou-se que é apenas suficiente causar stresse osmótico, pela presença de grandes concentrações de sacarose no meio de cultura, para induzir embriogênese em segmentos de meristema apical ou cotilédones após serem transferidos para um meio com baixa concentração de sacarose. Stresse salino também é capaz de induzir embriogênese em plântulas de cenoura (Rose et al. 2013).

Os tratamentos que levam à indução de embriões somáticos afetam diretamente ou indiretamente o equilíbrio hormonal e a resposta de sinais entre as células. A homeostasia de auxinas, como a sua síntese, transporte e estabilidade, pode ser influenciada pela alteração do estado redox intracelular devido ao aparecimento de espécies reativas de oxigênio (ROS) formadas nas células ao serem expostas a fatores de stresse (Zavattieri et al. 2010; Prudente et al. 2020). Concentrações altas de ROS são tóxicas, causando dano oxidativo, mas em quantidades específicas também podem agir como moléculas sinalizadoras, regulando várias respostas fisiológicas e de desenvolvimento (Zhou et al. 2016a; Prudente et al. 2020). Auxinas e ROS promovem desdiferenciação celular e induzem a replicação de células. Estas novas células irão tornar-se células totipotentes e algumas vão voltar a diferenciar para se especializar na via de desenvolvimento embriogênico (Rose et al. 2013).

#### **1.4. Objetivos**

Há mais de duas décadas que o potencial de regeneração e de embriogênese somática em feijoa é estudado. Devido às características do seu fruto, esta espécie é uma boa candidata para produção e comercialização internacional. Contudo, como se trata de uma planta lenhosa, existem fatores que limitam a eficiência da embriogênese somática nesta planta.

A maioria dos estudos feitos em feijoa, anteriormente referidos, centraram-se apenas na análise do efeito de combinações de diferentes reguladores de crescimento, meios, tipos de explante, outros compostos orgânicos na indução e desenvolvimento dos embriões somáticos. No presente trabalho, a nossa hipótese de estudo foi que outros fatores de stress, para além das

auxinas, menos conhecidos e menos utilizados podem, só por si, induzir embriogénese somática ou potenciar a sua expressão. Para testar esta hipótese utilizou-se como sistema experimental a feijoa, uma espécie em que os cotilédones podem evoluir para folhas fotossintéticas ou, quando cultivados na presença de 2,4-D ou de outra auxina, formar embriões somáticos após alguma desdiferenciação celular. Este modelo de estudo foi otimizado no nosso laboratório em ensaios anteriores e tem a vantagem de, ao contrário de outros sistemas embriogénicos, não necessitar da transferência dos explantes para meios sem auxina para que os embriões se formem. Dito de outra maneira, trata-se de um sistema de embriogénese num só passo (*one-step-embryogenesis*).

## 2. Materiais e métodos

---

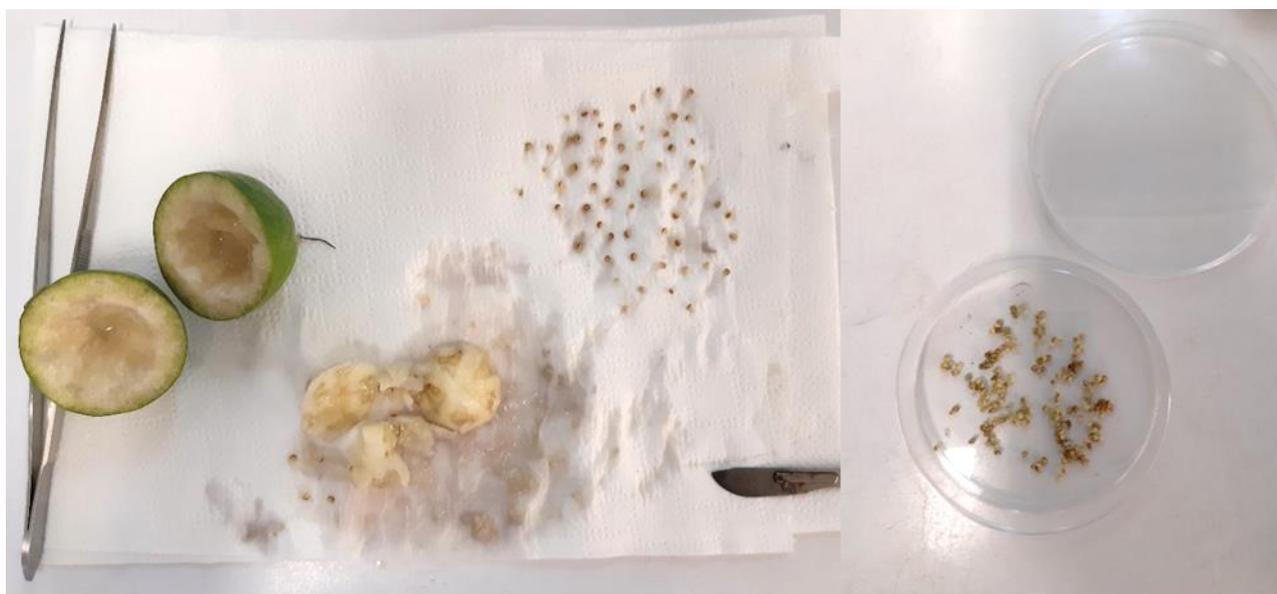




## 2.1 Material vegetal

O material vegetal utilizado nos ensaios experimentais foram embriões zigóticos extraídos das sementes dos frutos de uma árvore de feijoa originária da região de Aveiro. Como a feijoa é uma espécie exótica em Portugal é apenas encontrada como planta ornamental ou de cultivo. Os frutos foram colhidos entre finais de agosto e início de setembro e mantidas a 4 °C até posterior remoção das sementes.

As sementes foram extraídas da polpa dos frutos com a ajuda dum bisturi e pinça (Figura 5) e foram seguidamente lavadas em água destilada com a ajuda dum passador. Para impedir contaminações nos ensaios experimentais, as sementes foram esterilizadas numa solução a 7% de hipoclorito de cálcio durante 10 min e seguidamente lavadas várias vezes com água destilada esterilizada numa câmara de fluxo e armazenadas a 4 °C, em caixas de Petri com água, para embebição e ulterior facilidade de remoção dos embriões.



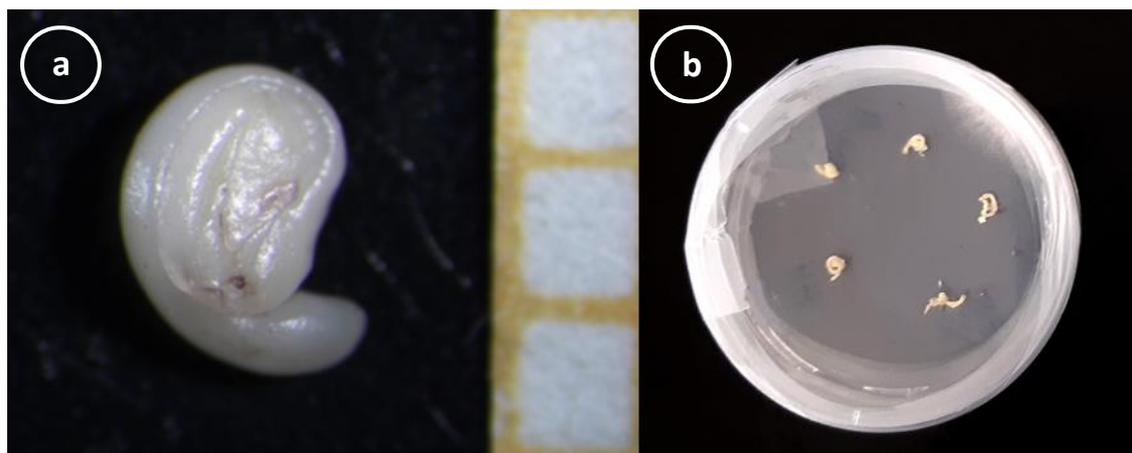
**Figura 5.** Fruto e sementes de feijoa utilizadas nos ensaios experimentais. À esquerda pode observar-se um fruto cortado transversalmente e em que a polpa foi removida para isolamento (ao centro) e armazenamento das sementes (à direita) lavagens.

## 2.2 Efeito de fatores de stresse

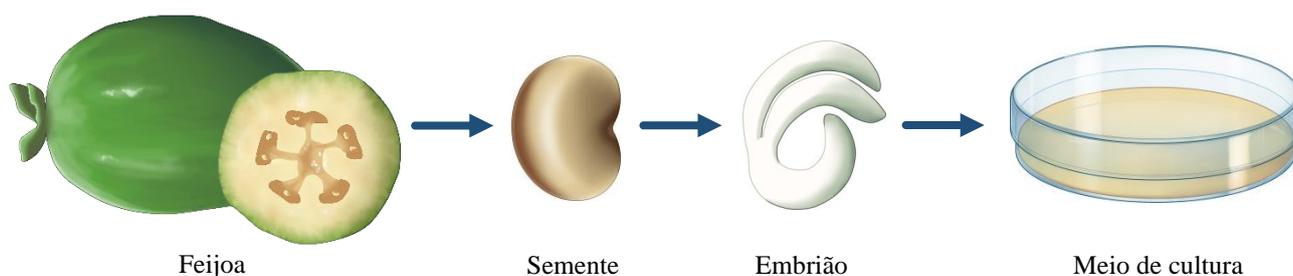
### 2.2.1. Condições de cultura

Cada ensaio experimental foi realizado com o mesmo meio de cultura base. Com o intuito de induzir o desenvolvimento dos explantes e embriogénese somática foi usado o meio base MS (Murashige and Skoog 1962). A cada meio foram adicionadas uma fonte de carbono [3% (p/v) de sacarose] e uma substância gelificante (agar). Nos meios para induzir embriogénese somática foi adicionada uma auxina (1,0 mg/L de 2,4-D) e a concentração de sacarose aumentada para 9% (p/v). Antes da adição de agar, o pH de cada meio foi ajustado para o intervalo de 5,7 a 5,8 utilizando soluções de NaOH ou HCl. O meio MS sem auxina serviu de controlo e para promover o desenvolvimento normal dos embriões zigóticos em plântulas (germinação). Após a esterilização dos meios num autoclave, estes foram distribuídos por caixas de Petri (6 cm de diâmetro) com o auxílio de uma pipeta esterilizada.

O isolamento dos embriões intactos é um processo delicado devido à reduzida dimensão das sementes e ao facto do embrião se encontrar enrolado no interior da testa (Figura 5a). Como as sementes ficaram armazenadas em caixas de Petri com água destilada, a testa destas ficou mais mole, facilitando o processo de remoção dos embriões. Numa caixa de Petri esterilizada com uma pequena camada de água destilada esterilizada (para impedir a secura dos explantes), o tegumento das sementes pode ser rasgado ou rompido com o auxílio de pinças de ponta fina ou outras ferramentas pontiagudas, permitindo a fácil extração do embrião zigótico. Os embriões foram depois inoculados nas caixas de Petri anteriormente referidas com meio de cultura (5 embriões por caixa, 3 réplicas por variável) (Figura 5b), seladas com Parafilm, devidamente identificadas e colocadas numa estufa no escuro a  $25 \pm 1$  °C, para permitir indução de embriogénese ou germinação (Figura 6).



**Figura 5.** Dimensão de um embrião zigótico extraído da semente (a); Embriões zigóticos em meio de cultura MS no início do processo de embriogênese somática (b).



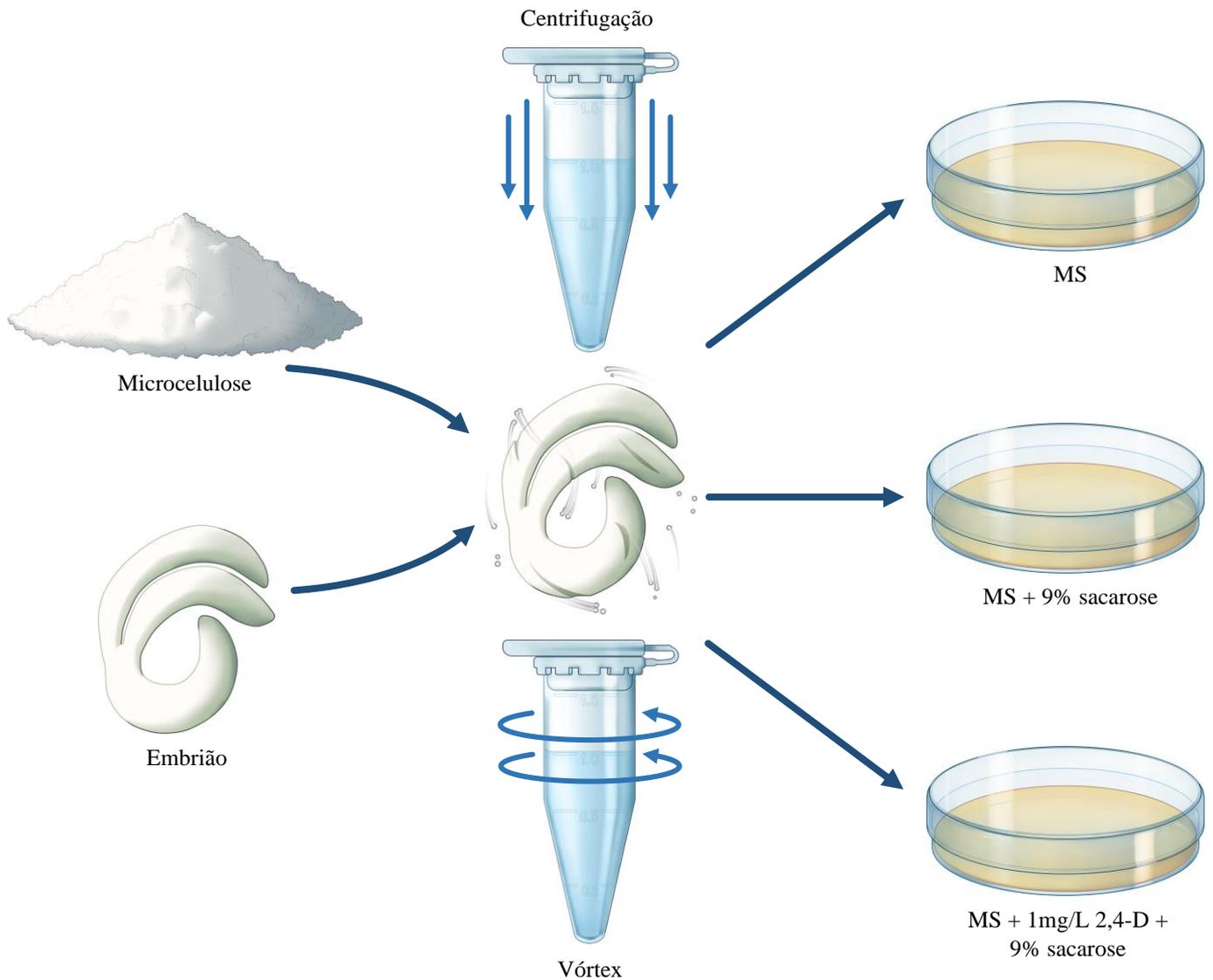
**Figura 6.** Síntese esquemática da preparação para embriogênese somática em embriões de feijoa.

### 2.2.2. Tratamento com microcelulose

Neste ensaio foi avaliado se o ferimento dos explantes causará maior formação de calos e por consequência uma maior indução de embriões somáticos. Devido ao diminuto tamanho dos explantes, foi usada microcelulose gentilmente cedida pelo Instituto de Investigação RAIZ (The Navigator Company). Em todos os ensaios, a microcelulose foi previamente esterilizada por autoclavagem a 121 °C e 1,1 atm durante 30 minutos.

Foram preparados 3 meios MS, um meio com 3% sacarose, um com 9% de sacarose e outro com 1,0 mg/L de 2,4-D e 9% de sacarose. Foram feitos 3 tratamentos aos explantes (para cada meio), cada um com 3 réplicas para cada meio, o primeiro serviu como controle, não havendo alteração do estado dos explantes, no segundo e terceiro (Figura 7), os embriões foram

expostos a microcelulose para se induzirem lesões. Num deles os embriões zigóticos e microcelulose foram adicionados a tubos de centrifugação com água destilada e colocados numa centrifugadora a 1000 rpm durante 5 min, enquanto noutro, os tubos foram agitados num vórtex durante 1 min. Finalmente, os embriões foram lavados em água destilada e limpos com a ajuda de papel de filtro esterilizado e inoculados nos respectivos meios.

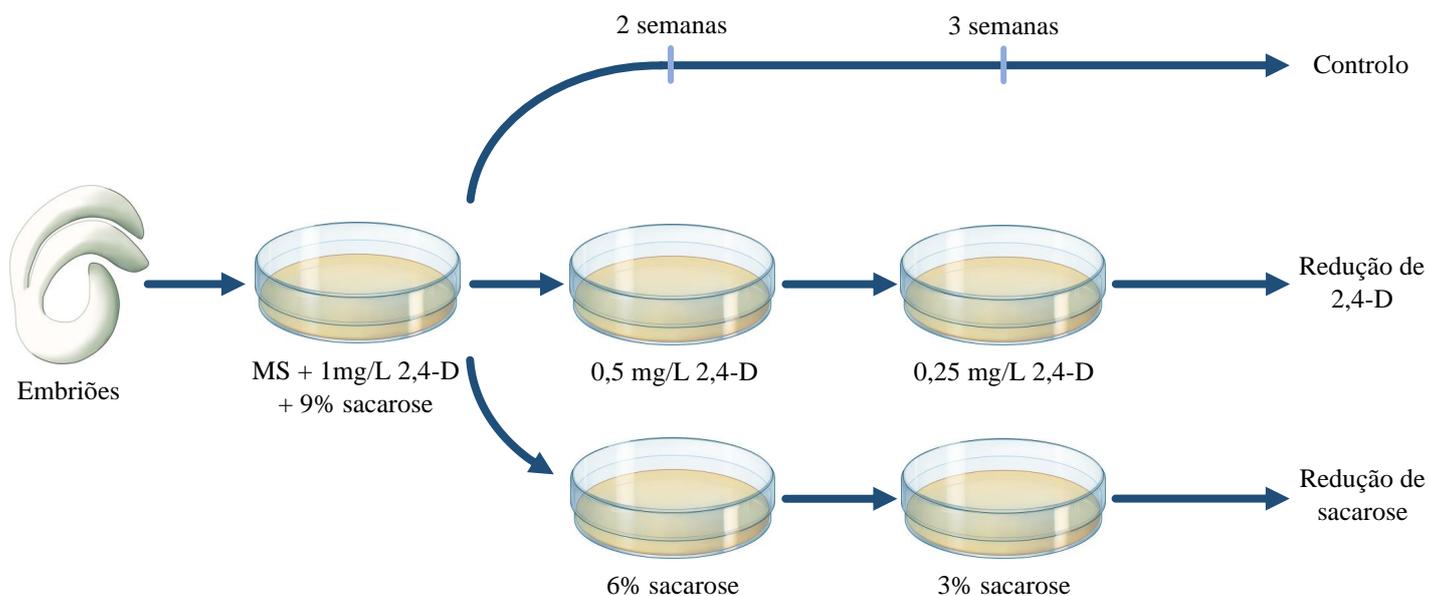


**Figura 7.** Representação esquemática dos tratamentos com microcelulose. As condições abrasivas da celulose em centrifugação e vórtex originam ferimentos nos embriões.

### 2.2.3. Efeito dos níveis de 2,4-D e sacarose

Neste ensaio pretendeu-se avaliar se uma diminuição da concentração de 2,4-D ou sacarose durante o período de cultura afetava a indução de embriogénese somática. Foram produzidos 5 meios MS, o meio inicial, 2 meios para os ensaios de concentração decrescente de auxina e outros 2 para os ensaios de concentração decrescente de sacarose. O meio inicial tinha concentrações de 2,4-D e sacarose típicas para a indução de embriogénese somática em feijoa, já referidas anteriormente. Este meio serviu de controlo e também de ponto temporal inicial para todos os explantes. Na via decrescente de 2,4-D, foi feito um meio com 0,5 mg/L e outro com 0,25 mg/L deste regulador de crescimento (concentrações de sacarose iguais às do meio inicial). Por outro lado, na via decrescente de sacarose, foi feito um meio com 6% e outro com 3% (concentrações de 2,4-D idênticas às do meio inicial).

Foram preparados 5 meios MS: o meio inicial (controlo) contendo 1,0 mg/L de 2,4-D e 9% (p/v) de sacarose; dois meios em que a concentração de 2,4-D foi reduzida para 0,5 mg/L e 0,25 mg/L e outros dois meios em que a concentração de sacarose foi reduzida para 6% (p/v) e 3% (p/v). Na via de 2,4-D decrescente, os embriões zigóticos foram inicialmente colocados em cultura *in vitro* no meio controlo. Ao fim de 2 semanas de cultura foram transferidos para meios com 0,5 mg/L (e 9% de sacarose) e finalmente passados mais 7 dias, para o meio com 0,25 mg/L (e 9% de sacarose) onde permaneceram até final do ensaio. No tratamento em que se foi progressivamente reduzindo a sacarose, os embriões passaram do meio controlo para um meio com 6% de sacarose (e 1,0 mg/L de 2,4-D), às 2 semanas, e ao fim de 7 dias foram ulteriormente transferidos deste meio para um meio contendo 3% de sacarose (e 1,0 mg/L de 2,4-D) onde se mantiveram até final do ensaio (Figura 8).



**Figura 8.** Representação do desenho experimental do ensaio de efeitos dos níveis de 2,4-D e sacarose.

#### 2.2.4. Efeito do pH dos meios

Para determinar a influência do pH durante o processo de embriogênese somática, foi realizado um ensaio para se identificar possíveis diferenças na formação de calos e embriões somáticos nos explantes de feijoa em função do pH inicial do meio de indução. Neste ensaio foi utilizado como meio de indução de embriogênese somática um meio contendo 1,0 mg/L de 2,4-D e 9% de sacarose e os seguintes valores de pH [4,5; 5,0; 5,8 (controlo); 6,5; 7,0]. O pH de todos os meios foi ajustado antes da autoclavagem utilizando soluções de NaOH ou HCl.

#### 2.2.5. Efeito do stresse oxidativo

Neste ensaio testou-se o efeito de uma exposição a um composto indutor de stresse oxidativo para determinar se este tipo de stresse tem algum efeito na embriogênese somática de feijoa. Assim, os embriões foram tratados com diferentes concentrações (v/v) de peróxido de hidrogénio (10 volumes) esterilizado, nomeadamente 3%, 0,3%, 0,15%, 0,06% e 0% (controlo). Após remoção do excesso de  $H_2O_2$  com papel de filtro, os embriões foram imediatamente transferidos para meio de indução de embriogênese somática: meio base MS contendo 1,0 mg/L de 2,4-D e 9% de sacarose.

### 2.2.6. Tratamento com NaCl

Nesta experiência foi avaliado se o efeito do stresse salino afeta a indução de embriogênese somática. Foram preparados 8 meios divididos em 2 grupos. O primeiro grupo tinha meio MS base contendo 1,0 mg/L de 2,4-D e 6% sacarose. O segundo tinha 1,0 mg/L de 2,4-D e 3% sacarose. Em ambos os grupos, foi adicionado NaCl em 4 concentrações diferentes [0,02%; 0,01%; 0,005% e 0% (controle)].

### 2.3. Análise fenotípica

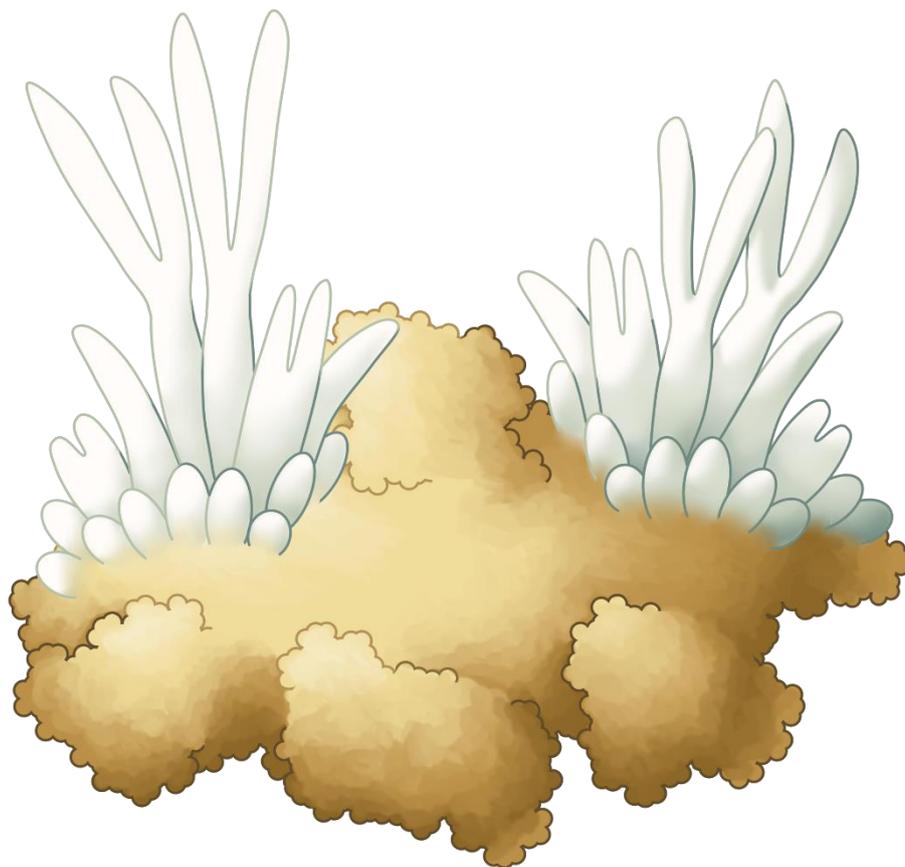
Em feijoa, os embriões somáticos induzidos apresentam com frequência anomalias morfológicas (Pescador et al. 2008). Nesta experiência, foi utilizado um meio MS com 1,0 mg/L de 2,4-D e 9% sacarose para induzir a embriogênese somática, permitindo a posterior análise do fenótipo dos embriões somáticos. Foram inoculados 50 embriões zigóticos em 10 caixas de Petri (6 cm de diâmetro) com meio de cultura, seladas com Parafilm e colocadas numa estufa no escuro a  $25 \pm 1$  °C. Após 8 semanas, foram selecionados 10 explantes com os embriões somáticos mais desenvolvidos, para uma fácil análise à lupa e os diferentes fenótipos observados caracterizados.

### 2.5. Análise estatística

Por regra, os ensaios de indução de embriogênese somática testando diferentes fatores foram terminados após 8 semanas de cultura, tempo suficiente para a formação dos embriões. Nessa altura determinou-se a percentagem de explantes que sofreram embriogênese e, em vários ensaios o número de embriões somáticos produzidos. Salvo indicação em contrário cada ensaio consistia em 3 réplicas com 5 embriões por réplica, num total de 15 embriões. Posteriormente, os dados foram organizados por variável e por ensaio experimental. Análise estatística foi feita através da utilização de ANOVA de uma via no GraphPad Prism (v. 8.4.3 para Windows, San Diego, CA, USA), seguido dum teste de Tukey para comparação das médias ( $p < 0.05$ ).

### 3. Resultados

---



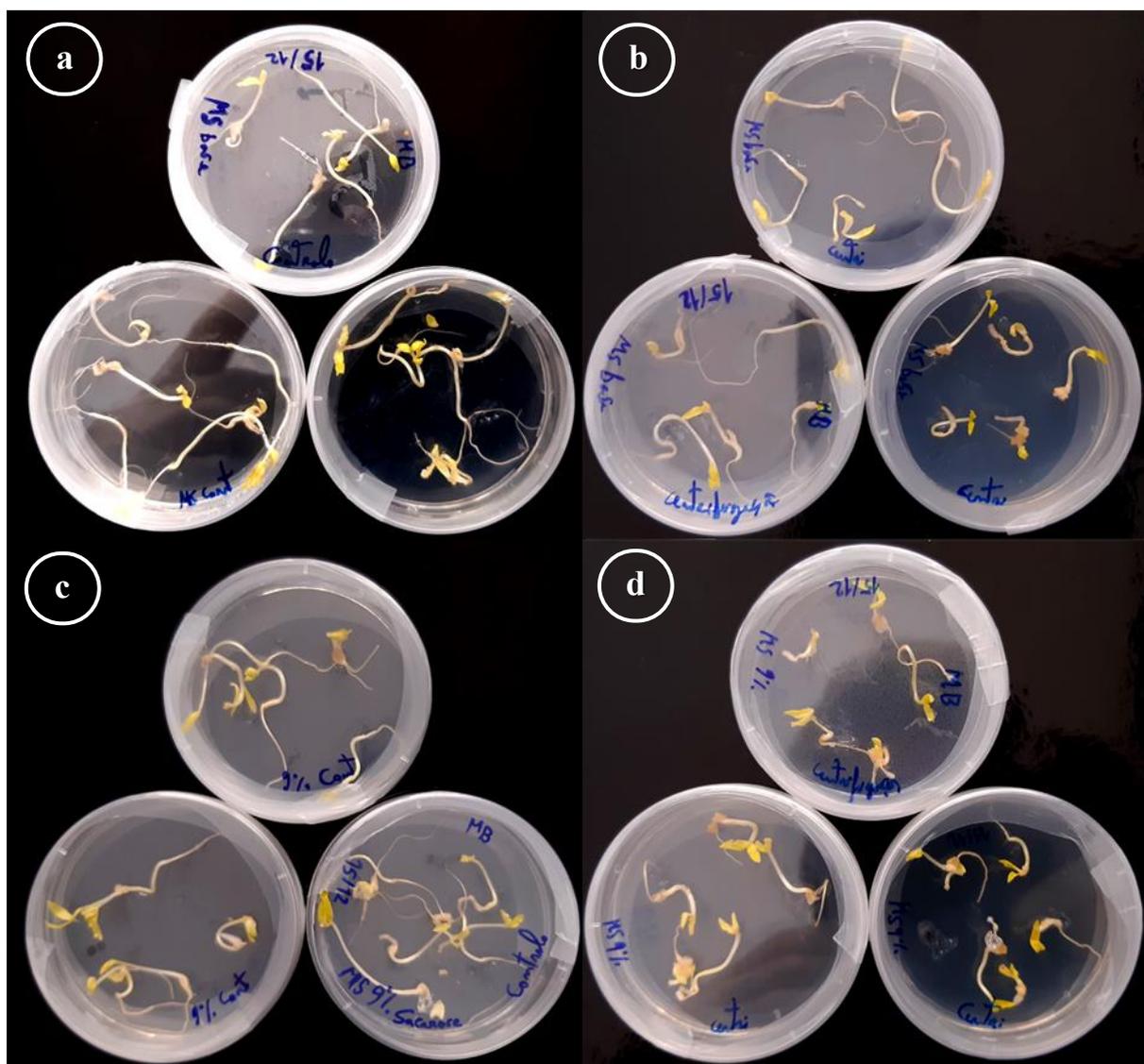


### 3.1. Efeito de fatores de stresse

#### 3.1.1. Tratamento com microcelulose

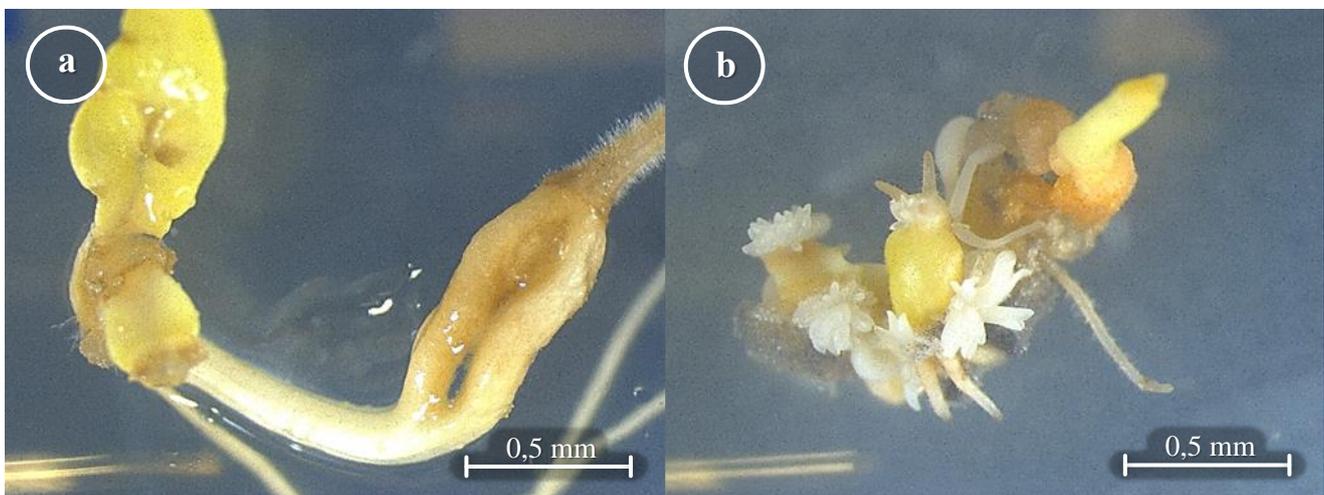
Os embriões zigóticos nos meios MS e MS com 9% sacarose desenvolveram-se como num processo de germinação habitual. Às 4 semanas, os embriões zigóticos já estavam completamente desenvolvidos em plântulas, mas havia diferenças notáveis nos fenótipos das plântulas entre cada tratamento. No meio MS controlo, as plântulas tinham um caule e raiz mais compridos, quando comparadas com as do meio MS do tratamento centrifugação (Figura 9a-b). Muitos dos explantes deste último meio tinham metade do tamanho daqueles presentes no controlo. No entanto, quer no meio MS do tratamento centrifugação, quer em MS do tratamento vórtex, as plântulas formaram calos principalmente com origem na raiz e caule e lesões notórias (Figura 10a). Nos meios MS e 9% sacarose, os explantes tiveram um comportamento semelhante aos dos meios MS (Figura 9c-d).

O processo de embriogénese somática nos meios MS com 1mg/L 2,4-D e 9% sacarose decorreu numa forma previsível. Uma distinção notada foi a diferença do crescimento do hipocótilo e cotilédones dos explantes entre os tratamentos. Como o processo de embriogénese somática em feijoa é indireto, a indução de embriões somáticos apenas ocorre após a formação de calos nos explantes. Às 4 semanas, os explantes já tinham desenvolvido calos visíveis com origens no hipocótilo e/ou cotilédones. Os calos formados apresentavam aspetos diferentes, até no mesmo explante. Alguns calos tiveram um crescimento mais acelerado do que outros. Para além disso, a cor dos calos é uma característica importante, pois revela o tipo de competência que estes possuem. Por exemplo, calos com cor esbranquiçada ou brancos apresentam, por norma, competência embriogénica. Nos meios MS e MS com 9% sacarose, os calos eram no geral mais pequenos (aqueles presentes nos meios de sacarose eram os maiores dos dois), tinham uma textura húmida entre o enrugado e liso, apresentando colorações acastanhadas e em certos casos (calos que se formaram a partir da raiz) exibiam uma cobertura de pelos radiculares (Figura 11 a). Por outro lado, os calos dos meios com auxina eram maiores no geral, tinham uma textura seca e rugosa ou granulosa e exibiam colorações pouco saturadas, ou seja, tons de bege acinzentados ou esbranquiçados (Figura 11 b).

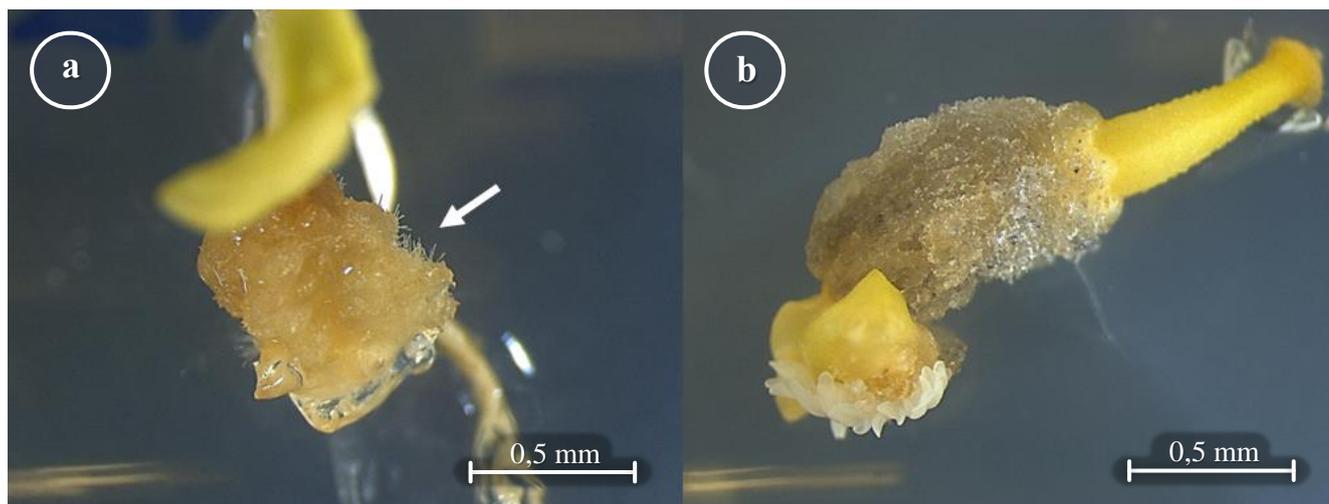


**Figura 9.** Réplicas do meio MS tratamento controlo (a); Réplicas meio MS tratamento centrifugação (b); Réplicas do meio MS com 9% sacarose tratamento controlo (c); Réplicas do meio MS com 9% sacarose tratamento controlo (d).

Neste ensaio, os primeiros embriões somáticos apareceram às 6 semanas, havendo o desenvolvimento de mais a partir deste ponto (Figura 10b). Apenas nos tratamentos do meio MS com 1mg/L 2,4-D e 9% sacarose ocorreu embriogênese somática (com exceção da formação duma raiz entre os cotilédones no meio MS do tratamento vórtex e num calo no meio MS e 9% sacarose do tratamento centrifugação) (Tabela 1). O tratamento de centrifugação demonstrou ser aquele com maior explantes com embriões somáticos (86,67%), seguido do vórtex (80,00%) e controlo (66,67%). O número de embriões somáticos por explante foi muito variável (Figura 12). Por exemplo, no tratamento de centrifugação há uma explante com apenas 1 embrião somático e outro com 101, mas no geral, a maioria do explantes originou mais de 10 embriões somáticos. Devido à assincronia da embriogênese somática, os embriões somáticos exibiam as várias fases do desenvolvimento embrionário (principalmente cordiforme e torpedo). As médias de embriões somáticos entre os tratamentos foram diferentes (Tabela 1). Foi o tratamento de centrifugação que demonstrou a maior média de embriões somáticos e por outro lado o tratamento vórtex a menor delas. Apesar da diferença aparente das médias, o tratamento estatístico revelou que os dados não apresentam diferenças significativas (Tabela 1).



**Figura 10.** Calos e lesões num explante de meio MS tratamento centrifugação (a); Embriões somáticos em meio MS tratamento centrifugação (b).



**Figura 11.** Diferença do aspeto dos calos entre tratamentos sem (a) e com (b) 2,4-D. Os calos em (a) exibiam cores acastanhadas e em certos casos uma cobertura de pelos radiculares. Em (b), os calos tinham uma textura seca granulosa e exibiam colorações pouco saturadas

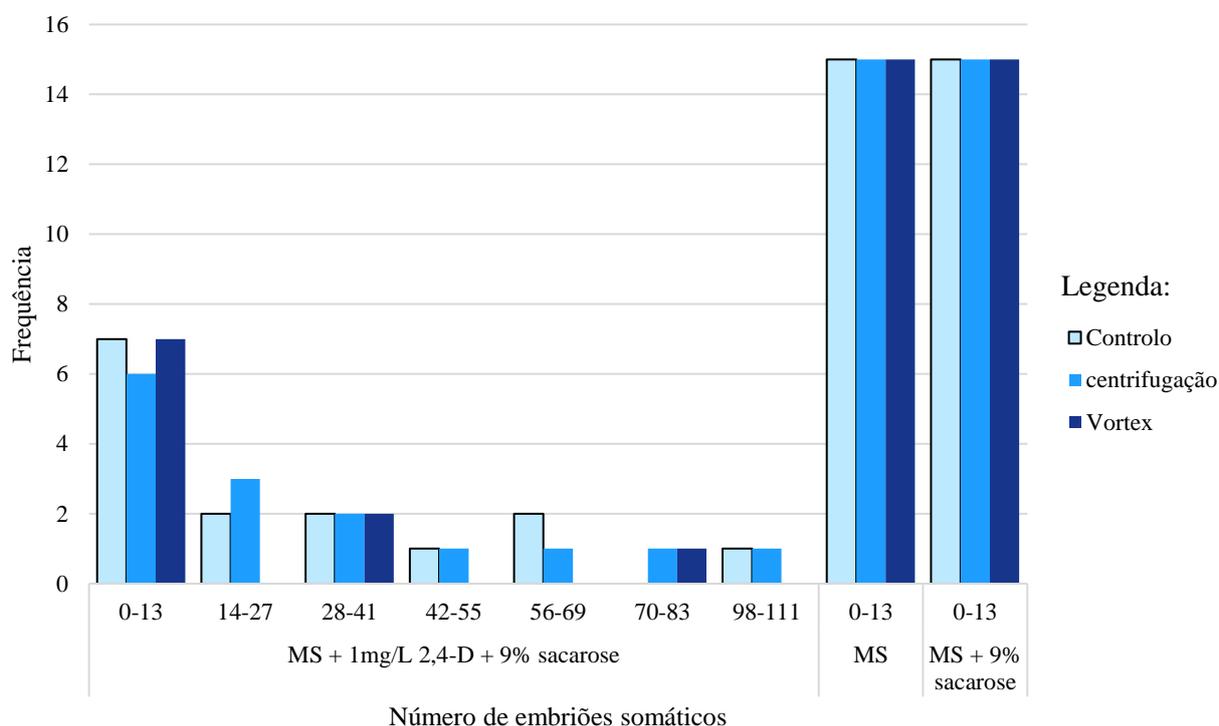
**Tabela 1.** Efeitos de diferentes tratamentos de microcelulose em diferentes tipos de meio de cultura em embriões zigóticos de feijoa. Os resultados foram obtidos após 8 semanas de cultura.

Meio e tratamento	Explantos com embriões somáticos (%)*	Média de embriões somáticos por explante $\pm$ Desvio Padrão**
<i>MS + 1mg/L 2,4-D + 9% sacarose</i>		
Controlo	66,67	25,47 $\pm$ 30,11 <sup>a</sup>
Centrifugação	86,67	31,87 $\pm$ 31,07 <sup>a</sup>
Vórtex	80,00	16,80 $\pm$ 22,82 <sup>a</sup>
<i>MS</i>		
Controlo	0	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>
Centrifugação	0	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>
Vórtex	13,33	0,13 $\pm$ 0,35 <sup>b</sup>
<i>MS + 9% sacarose</i>		
Controlo	0	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>
Centrifugação	0	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>
Vórtex	0	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>

\* Foram contabilizados todos os explantes de cada tratamento com pelo menos um embrião somático.

\*\* Cálculo da média  $\pm$  SD de 3 réplicas com n=5, do número de embriões somáticos por cada tratamento.

Diferentes letras representam diferenças significativas entre os tratamentos ( $P \leq 0,05$ ).



**Figura 12.** Histograma do número de embriões somáticos por explante e tipo de meio nos tratamentos com microcelulose. Contagens efetuadas após 8 semanas de cultura.

### 3.1.2. Efeito dos níveis de 2,4-D e sacarose

Neste ensaio, todos os embriões zigóticos se desenvolveram de forma semelhante no meio inicial não havendo diferenças entre os vários tratamentos antes da mudança dos explantes para os meios com sacarose ou auxina reduzida, após 2 semanas de cultura. Na mudança de meio seguinte, às 3 semanas, verificou-se que nos meios de sacarose reduzida os hipocótilos e cotilédones da maioria dos explantes tinham-se desenvolvido mais, comparativamente com os dos meios de auxina reduzida. Para além disso, o crescimento dos calos foi ligeiramente superior nestes últimos.

A partir das 5 semanas, começaram a aparecer algumas diferenças fenotípicas entre os tratamentos. Nos meios controlo e de sacarose reduzida, os explantes começaram a desenvolver raízes adventícias (característica ausente nos explantes de meio auxina reduzida) (Figura 13 c-d). Os explantes controlo demonstraram ter o maior crescimento de calos, seguidos dos presentes no meio de auxina decrescente e, finalmente, daqueles cultivados no meio de sacarose

reduzida. Adicionalmente, os calos do meio de sacarose reduzida exibiam cores mais escuras que os outros tratamentos

No final do ensaio, as diferenças fenotípicas referidas anteriormente estavam mais evidentes. Os explantes dos meios controlo de e sacarose reduzida tinham várias raízes muito alongadas, enquanto no meio de auxina reduzida apenas se desenvolveram raízes curtas e em menor número (Figura 13 a). No meio de controlo, os calos tinham um grande volume, por outro lado, os calos do meio de sacarose decrescente demonstraram não ter crescido mais desde as 5 semanas e a maioria exibia uma textura mais seca e uma tonalidade castanho-escura (Figura 13 b).

Mais de metade dos explantes por cada tratamento desenvolveu embriões somáticos (100% em controlo; 93,33% em redução de 2,4-D e 66,67% em redução de sacarose) (Tabela 2). Especificamente no controlo houve a indução em todos os explantes e no meio de auxina reduzida, a indução não ocorreu apenas num explante. Este ensaio também demonstrou a grande variabilidade do número de embriões por explante (Figura 14) e as fases embrionárias que estes exibiam (maioritariamente cordiforme e torpedo). Dentro das médias, o tratamento de 2,4-D reduzido (Tabela 2) foi aquele que demonstrou um valor superior (quase dobro do controlo). No entanto, a análise estatística revelou que não ocorrem diferenças significativas.

**Tabela 2.** Efeitos da redução dos níveis 2,4-D e sacarose em meios de indução de embriogénese somática em embriões zigóticos de feijoa. Os resultados foram obtidos após 8 semanas de cultura.

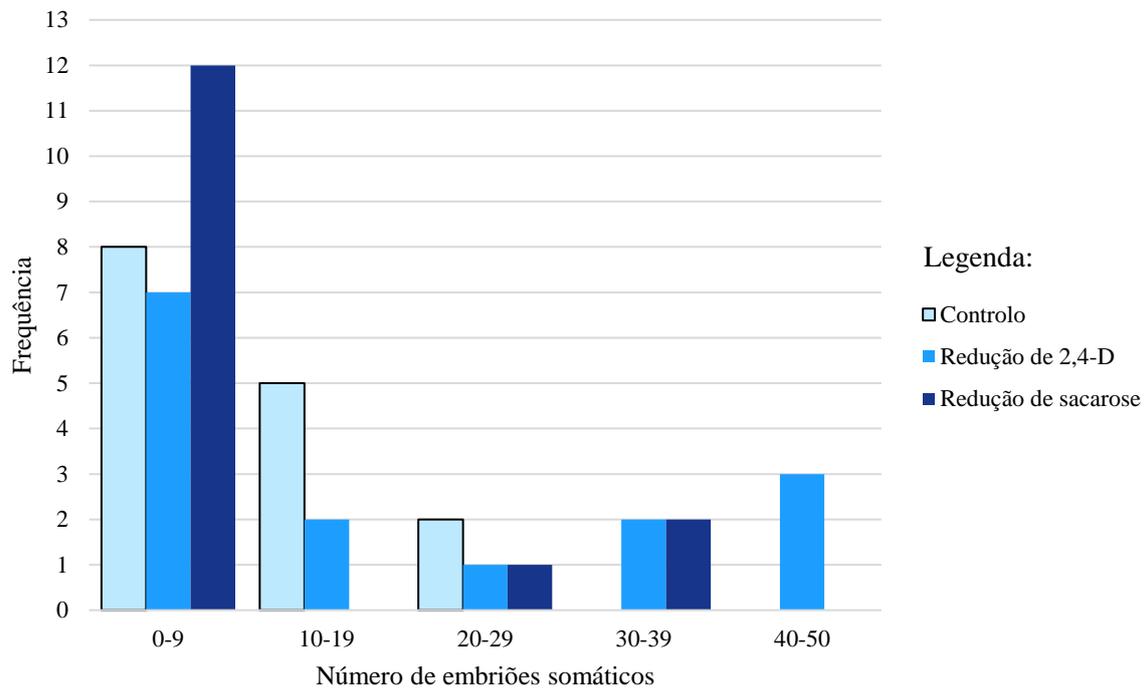
Substância reduzida	Explantes com embriões somáticos (%)*	Média de embriões somáticos por explante $\pm$ Desvio Padrão**
Controlo	100	9,73 $\pm$ 7,39 <sup>a</sup>
Redução de 2,4-D	93,33	18,13 $\pm$ 17,50 <sup>a</sup>
Redução de sacarose	66,67	8,13 $\pm$ 11,30 <sup>a</sup>

\* Foram contabilizados todos os explantes de cada tratamento com pelo menos um embrião somático.

\*\* Cálculo da média  $\pm$  SD de 3 réplicas com n=5, do número de embriões somáticos por cada tratamento. Diferentes letras representam diferenças significativas entre os tratamentos ( $P \leq 0,05$ ).



**Figura 13.** Embriões somáticos nos cotilédones de explante do tratamento redução 2,4-D (a); Calo num explante do tratamento redução sacarose (b). Apresenta uma textura seca e cor castanha; Explante controlo com o desenvolvimento de raízes adventícias (c); Formação de raízes num explante com redução da sacarose (d).



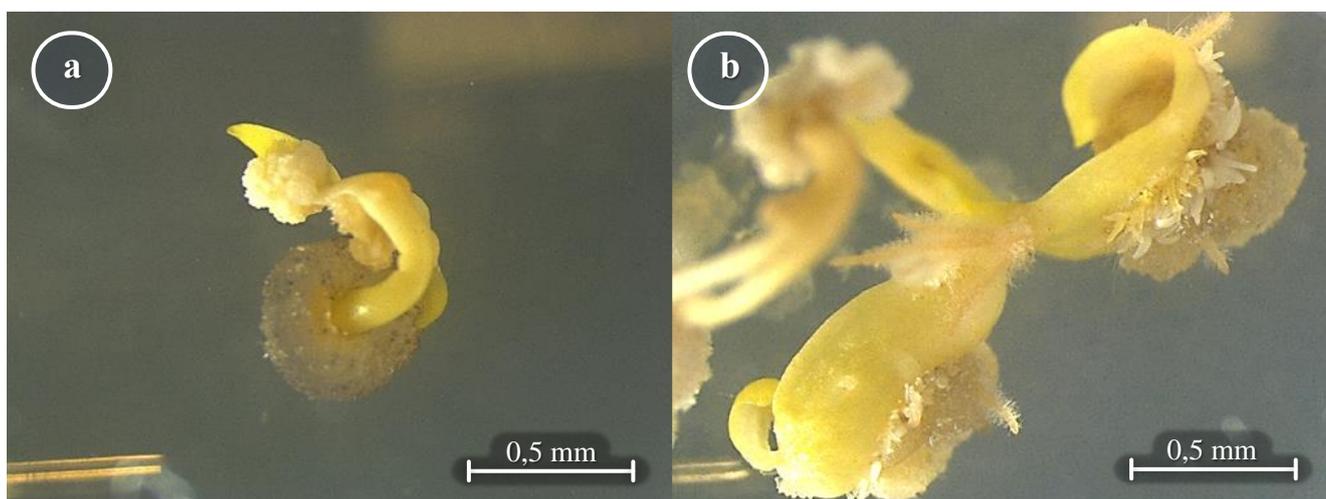
**Figura 14.** Histograma do número de embriões somáticos por explante nos meios de redução dos níveis de 2,4-D e sacarose. Contagens efetuadas após 8 semanas de cultura.

### 3.1.3. Efeito do pH dos meios

O desenvolvimento dos explantes e a formação de calos entre os tratamentos foi semelhante ao controlo. Desde início que os meios de pH 6,5 e 7,0 tiveram um maior crescimento dos calos relativamente aos outros meios, até ao final do ensaio (Figura 15). Como nos outros ensaios, os explantes exibiram um desenvolvimento diverso e no final do ensaio demonstraram características fenotípicas variadas. Alguns explantes apresentaram caules e cotilédones desenvolvidos, enquanto noutros foram apenas os calos que se desenvolveram.

Na maioria dos tratamentos mais de 80% dos explantes demonstraram indução de embriões somáticos (Tabela 3). O valor mais alto foi no meio pH 5,8 (93,33%). A única exceção foi o meio de pH 5,0 com apenas 66,67% de indução. A contagem dos embriões revela também a grandes diferenças no número de embriões por explante (Figura 16). Neste ensaio, a maioria dos embriões estavam nas fases globular, torpedado e cordiforme, mas havia um número superior de embriões mais desenvolvidos nos meios pH 5,8 e 6,0. As médias das contagens dos embriões somáticos foram semelhantes entre os pH 4,5; 5,8 e 7,5 (Tabela 3). Os valores mais baixos de

indução foram obtidos no meio de pH 5,0 (4,07), Por outro lado, a mais alta foi no de pH 6,5 (21,33). Segundo a análise estatística as diferenças entre as médias destes dois tratamentos são significativas, mas são não significantes quando comparadas com os restantes meios.



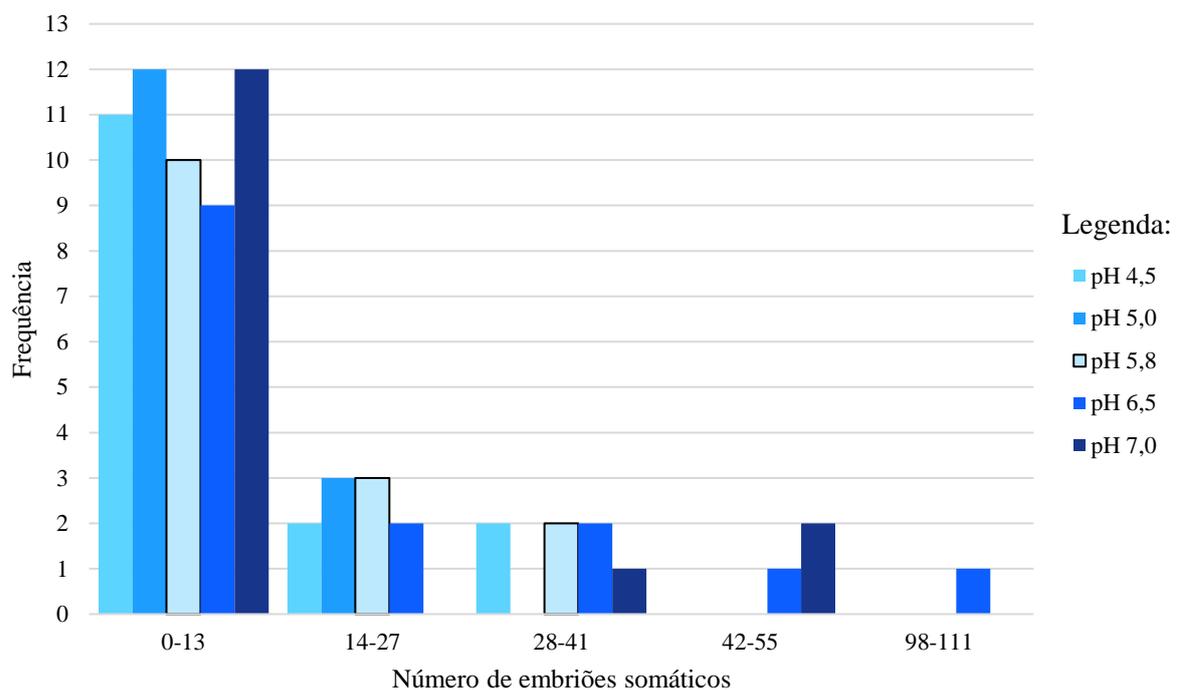
**Figura 15.** Explante de meio pH 5,0 (a). Em pH 5,0 os explantes desenvolveram pouco; Explante de meio pH 6,5 (b). Meio pH 6,5 foi um dos meios que exibiu crescimento mais rápido no início.

**Tabela 3.** Efeitos de diferentes valores de pH em meio de indução de embriogênese somática em embriões zigóticos de feijoa. Os resultados foram obtidos após 8 semanas de cultura.

Valor de pH	Explantes com embriões somáticos (%)*	Média de embriões somáticos por explante $\pm$ Desvio Padrão**
4,5	86,67	11,47 $\pm$ 11,36 <sup>a,b</sup>
5,0	66,67	4,07 $\pm$ 6,20 <sup>a</sup>
5,8	93,33	11,33 $\pm$ 9,99 <sup>a,b</sup>
6,5	86,67	21,33 $\pm$ 26,96 <sup>b</sup>
7,0	86,67	11,80 $\pm$ 17,92 <sup>a,b</sup>

\* Foram contabilizados todos os explantes de cada tratamento com pelo menos um embrião somático.

\*\* Cálculo da média  $\pm$  SD de 3 réplicas com n=5, do número de embriões somáticos por cada tratamento. Diferentes letras representam diferenças significativas entre os tratamentos ( $P \leq 0,05$ ).



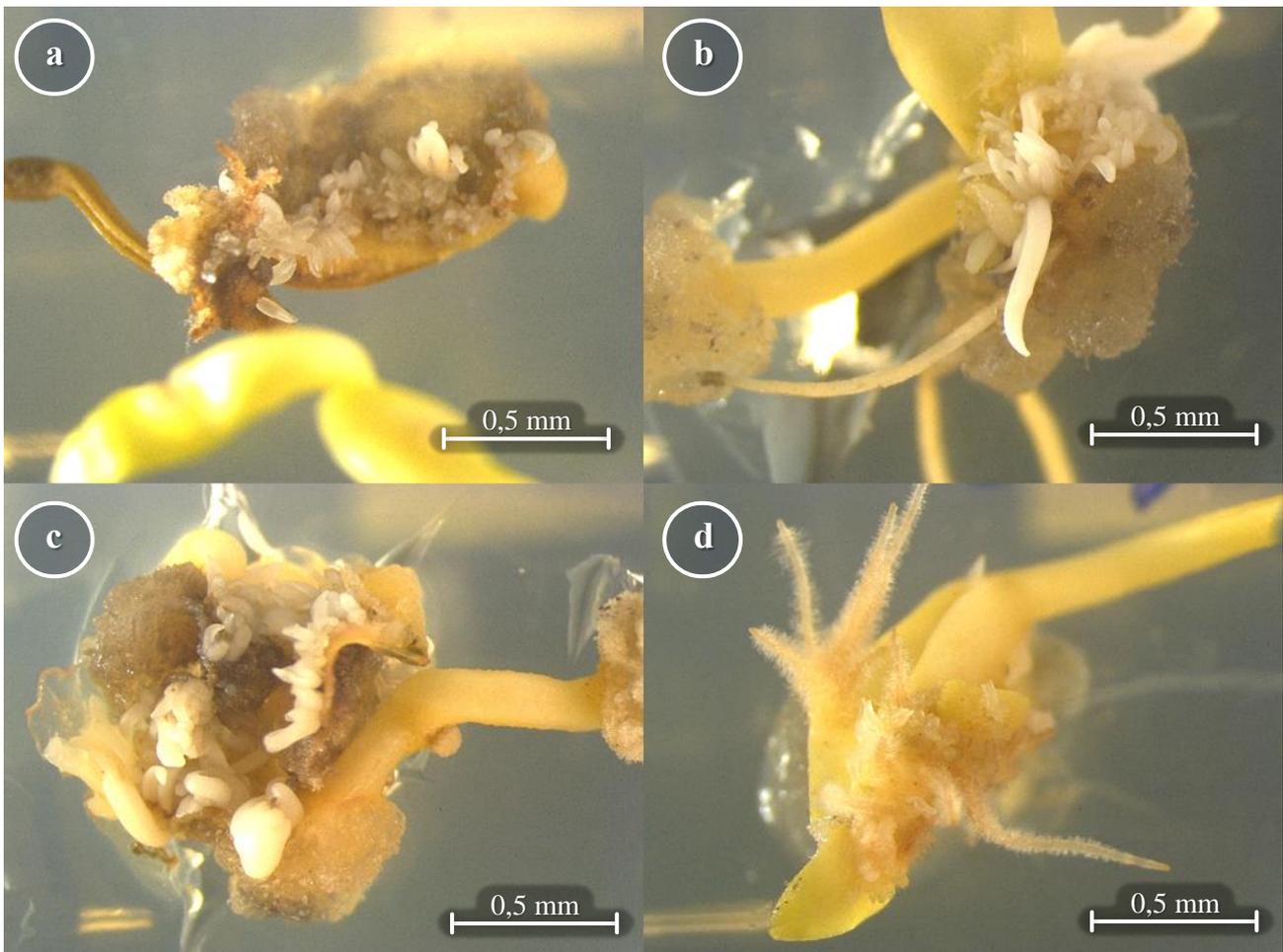
**Figura 16.** Histograma do número de embriões somáticos por explante de diferentes valores de pH. Contagens efetuadas após 8 semanas de cultura.

### 3.1.4. Efeito do stresse oxidativo

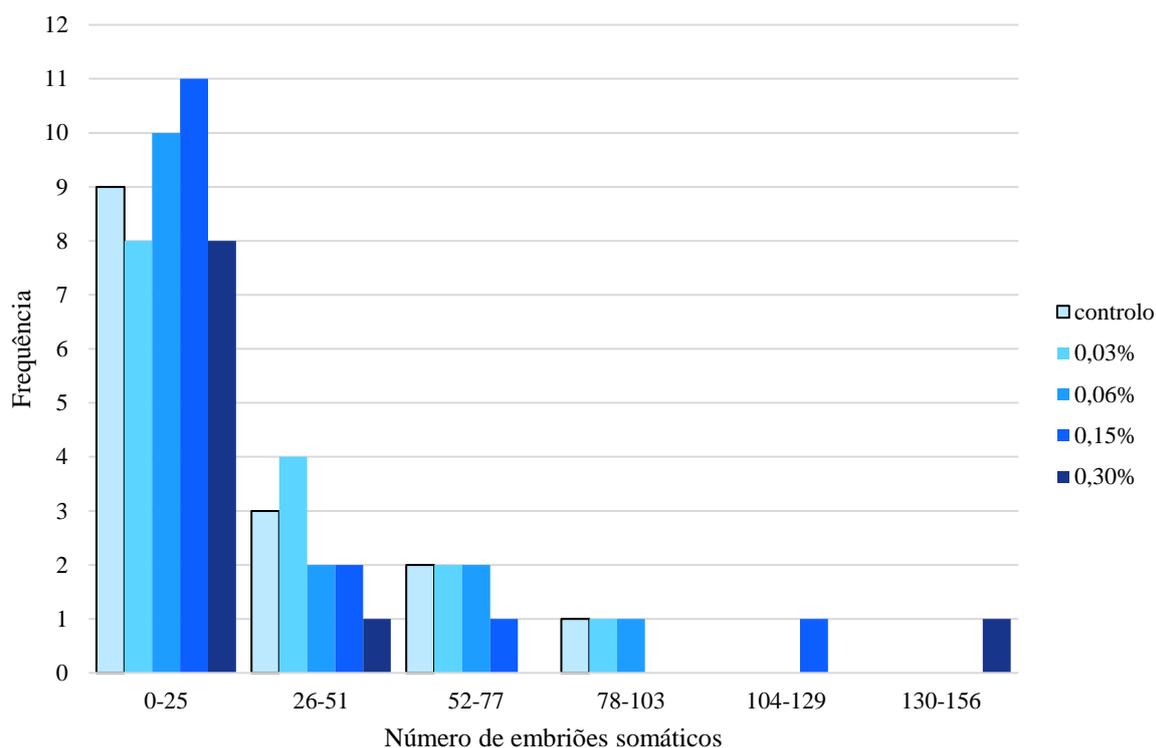
A indução de embriogénese somática nos tratamentos deste ensaio exibiu uma evolução equivalente à embriogénese somática em meio de cultura MS. Os tratamentos não revelaram diferenças significativas do desenvolvimento dos explantes comparados com o controlo. O processo de embriogénese somática foi muito semelhante aos controlos dos ensaios anteriores, tanto no desenvolvimento dos explantes, formação de calos e indução de embriões somáticos (Figura 17).

Em cada tratamento deste ensaio, pelo menos 60% dos explantes (Tabela 5) mostraram potencial embriogénico, sendo que a maior percentagem de indução ocorreu no tratamento com 0,03% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrogénio) (Tabela 4). O número de embriões somáticos por explante mostrou ser muito variável (Figura 18). Por exemplo, no tratamento 0,30% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> há um explante com apenas 1 embrião somático, mas também há o explante com o maior número de embriões somáticos deste ensaio. Os explantes exibiram embriões somáticas em diferentes fases embrionárias, sendo que as mais comuns eram a cordiforme e torpedo. Apesar

da grande variabilidade do número de embriões somáticos por explante, as médias de cada tratamento (Tabela 4) são muito semelhantes entre si, revelando que não existem diferenças significativas para a embriogênese somática neste ensaio.



**Figura 17.** Indução de embriogênese somática nos explantes dos tratamentos de choque  $H_2O_2$  0,06% (a); 0,15% (b); 0,30% (c) e 3% (d).



**Figura 18.** Histograma do número de embriões somáticos por explante nos tratamentos de stresse oxidativo. Contagens efetuadas após 8 semanas de cultura.

**Tabela 5.** Efeito de stresse oxidativo através da aplicação de choques de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em embriões zigóticos de feijoa antes da inoculação em meio de indução de embriogênese somática. Os resultados foram obtidos após 8 semanas de cultura.

Choque de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%)	Explantos com embriões somáticos (%)*	Média de embriões somáticos por explante ± Desvio Padrão**
Controlo	66,67	25,47 ± 30,11 <sup>a</sup>
0,03	86,67	25,40 ± 29,25 <sup>a</sup>
0,06	73,33	23,33 ± 27,65 <sup>a</sup>
0,15	60,00	23,67 ± 29,60 <sup>a</sup>
0,30	73,33	23,30 ± 41,67 <sup>a</sup>

\* Foram contabilizados todos os explantes de cada tratamento com pelo menos um embrião somático.

\*\* Cálculo da média ± SD de 3 réplicas com n=5, do número de embriões somáticos por cada tratamento. Diferentes letras representam diferenças significativas entre os tratamentos (P ≤ 0,05).

### 3.1.5. Tratamento com NaCl

Neste ensaio, em todos os meios de cultura com ou sem NaCl, os explantes morreram ou os embriões zigóticos não germinaram (Figura 19). Os embriões zigóticos que germinaram apenas se desenvolveram um pouco, havendo exemplos de alguns explantes que tinham iniciado a formação de calos. No entanto, todos os explantes estavam com uma cor castanha e com um aspeto semelhante, demonstrando que o seu desenvolvimento foi interrompido no mesmo intervalo de tempo.



**Figura 19.** Exemplo dum tratamento com NaCl e um explante observado à lupa.

### 3.2. Análise fenotípica

Os embriões zigóticos induzidos exibiam várias fases do desenvolvimento embriogénico. Conseguiu-se observar as diferentes fases (globular, cordiforme, torpeda e cotilédona). No entanto, a variabilidade do tamanho dos embriões somáticos, presença de anomalias e o agrupamento de vários embriões na mesma zona dificultava a distinção das fases embriogénicas para cada embrião somático. As anomalias dos embriões foram categorizadas e organizadas na Tabela 6. Vários dos embriões somáticos (19,31%) não tinham desenvolvido cotilédones ou se tivessem eram curtos (Figura 20 d). Isto resultou no desenvolvimento de

embriões ovais ou cónicos, sendo este um dos fenótipos mais comuns. Os embriões mais pequenos tinham formas esféricas e os maiores formas cónicas e alongadas. Por outro lado, ocorreram casos raros de embriões somáticos com mais do que 2 cotilédones (Figura 20 a). Os embriões somáticos fundidos (33,39%) eram os que apresentavam o tamanho mais pequeno e desenvolveram-se em aglomerados (Figura 20 b). Os embriões zigóticos de feijoa são brancos e esta característica é partilhada pelos embriões somáticos, mas alguns embriões somáticos (7,53%) exibiam coloração esverdeada (germinação precoce) (Figura 20 c).



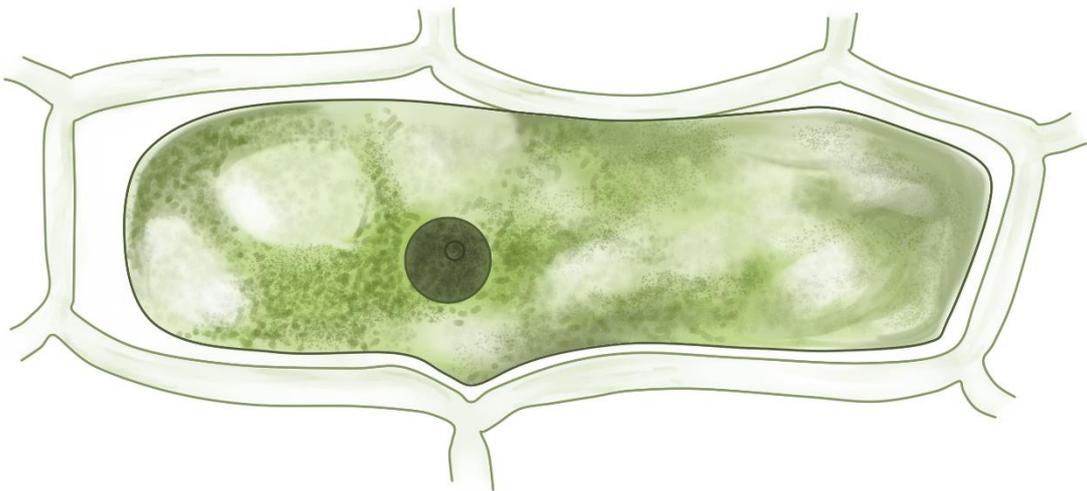
**Figura 20.** Diferentes aspetos dos embriões somáticos. Embrião somático com 3 cotilédones (a); Embriões somáticos fundidos (b); Germinação precoce em embriões (c); Embriões sem cotilédones (d).

**Tabela 6.** Percentagem de embriões somáticos normais e com anomalias em explantes de feijoa após 8 semanas de indução de embriogénese somática (n=611).

<b>Embriões normais (%)</b>	<b>Embriões com anomalias (%)</b>				
29,30	70,54				
	Embriões fundidos	Cotilédones ausentes ou pouco desenvolvidos	Cotilédones fundidos	Cotilédones extranumerários	Germinação precoce
29,30	33,39	19,31	9,00	1,31	7,53

## 4. Discussão

---





## 4.1. Efeito de fatores de stresse

### 4.1.1. Tratamento com microcelulose

As plantas conseguem reparar regiões lesionadas através da formação de calos (Bloch 1941, 1952). Nestes casos, os calos podem originar-se a partir de diferentes tipos de células (vasculares, córtex e medula) (Ikeuchi et al. 2013). Para proteção dos tecidos expostos ao ambiente externo, os calos induzidos por lesões tapam as zonas feridas para prevenir perda de água e infeções, por acumulação de fitoalexinas e proteínas que combatem patógenos (Ikeuchi et al. 2013, 2017). Para regenerar os tecidos ou órgãos lesionados, as células dos calos podem-se diferenciar em vários tipos de células, como as do sistema vascular, ou até mesmo fazer organogénese de novo, sugerindo que são altamente pluripotentes. Esta resposta defensiva é ativada quando são identificados padrões moleculares associados a danos, levando também à libertação de ROS (Chen et al. 2016; Bidabadi and Mohan Jain 2020).

As auxinas e citocininas estão bem estudadas como indutores eficazes de calos em cultura. Estudos recentes em *Arabidopsis* revelaram que a formação de calos em meios de cultura com altas concentrações de auxina segue um processo de desenvolvimento semelhante ao da formação radicular (Delessert et al. 2004; Ikeuchi et al. 2013, 2017). De facto, a expressão de genes desses calos assemelhasse à expressão de genes reguladores no meristema radicular.

Causar ferimentos como fator de stresse pode ter um papel importante na divisão celular, havendo a hipótese de conseguir aumentar a taxa de indução de embriogénese somática (Santarem et al. 1997). Devido à resposta natural de multiplicação e desdiferenciação celular em tecidos lesionados, este fator de stresse poderá possibilitar um aumento do número de embriões somáticos, através duma maior formação de calos, adiantado a formação de calos ou apenas ser o único fator necessário para induzir embriogénese somático, ou seja, ser desnecessário o uso de auxina no meio (*e.g.*, em *Arabidopsis*) (Delessert et al. 2004; Ikeuchi et al. 2013, 2017; Zhang et al. 2021). No caso da espécie em estudo, como é uma planta lenhosa este fator de stresse sozinho não foi suficiente para induzir embriogénese somática eficaz.

Vários estudos foram feitos para tentar perceber a biologia molecular por detrás dos processos que levam a que lesões em tecido vegetal induz a diferenciação nas células (Rojas-Herrera and Loyola-Vargas 2002; Chen et al. 2016; Ikeuchi et al. 2017, 2020; Zhang et al. 2021).

No entanto, na maioria dos estudos em que se aplica as diversas técnicas de micropropagação e regeneração de plantas, provocam-se lesões nos explantes apenas por ser necessária a excisão do tecido vegetal. Não há muitos exemplos de experiências em que se compara o efeito de lesões com tratamentos que não aplicam este stresse na embriogénese somática, especialmente em plantas lenhosas (Santarem et al. 1997; Hofmann et al. 2004; Boldaji et al. 2021).

Em *Arabidopsis* a incubação de hipocótilos cortados no escuro melhorou a eficiência da formação de calos de 50% para 70% (Ikeuchi et al. 2013, 2017). Nestes explantes a resposta de citocinina é elevada, mas o processo de como a lesão induz o aumento dos níveis de citocinina permanece pouco claro. Em híbridos de cana-de-açúcar (*Saccharum*) foi observada a formação de calos a partir das extremidades cortadas ou feridas em meio MS suplementado com 2,4-D (Kaur and Kapoor 2016). Uma das características mais notórias foi o acastanhamento dos calos. Ferir os explantes leva a que os compostos fenólicos que se encontram nos vacúolos misturem-se com o conteúdo de outros organitos e, conseqüentemente, aparece a pigmentação escura (Kaur and Kapoor 2016). Estes são compostos altamente reativos que polimerizam rapidamente, formam ligações com proteínas e também inibem a atividade enzimática, podendo assim resultar num acastanhamento dos calos (Pinto et al. 2008). O aspeto acastanhado de calos originados de lesões também foi observado nos explantes de feijoa deste ensaio, indicando que a microcelulose causou algumas lesões. No entanto, os calos formados nos meios MS e MS com 9% sacarose eram de uma dimensão muito pequena e em baixo número. Nos meios com 2,4-D dos tratamentos com microcelulose, houve diferenças, mas não foram significativas. Devido a estas observações, concluiu-se que os tratamentos executados com pó de celulose como método para lesionar os explantes não foram muito efetivos.

Na orquídea *Phalaenopsis* sp., alguns dos explantes (folhas e protocormos) foram cortados, fragmentados e inoculados em meio MS modificado com *Thidiazuron* (TDZ) (Boldaji et al. 2021). Foi comparado o efeito de lesões nos explantes a diferentes espetros de luz e demonstrou-se que os explantes demonstraram uma embriogénese somática direta em alguns destes tratamentos. Por outro lado, em soja (*Glycine max*), o ferimento dos explantes não aumentou o número de embriões formados e não foi observada nenhuma diferença entre os cultivares testados (Santarem et al. 1997; Hofmann et al. 2004). No entanto, nos explantes feridos, os embriões somáticos foram induzidos mais cedo do que nos explantes sem lesões (Santarem et al. 1997).

Os resultados dos estudos anteriormente referidos variam de espécie para espécie. Tal como a embriogénese somática pode ser afetada por fatores genéticos e epigenéticos, a resposta a lesões no contexto de indução de embriões somáticos também pode ser influenciada por estes

fatores. A metodologia aplicada de lesão dos explantes neste ensaio não levou a uma melhor eficiência do processo de embriogênese somática em feijoa, nem à indução deste processo em meios de cultura sem 2,4-D. Pensasse que um dos fatores foi a pouca quantidade de lesões dos explantes. Poderá ser feito um ensaio futuro com a uma aplicação mais eficaz deste fator de stresse para atestar se a lesão dos explantes de feijoa tem efeito na embriogênese somática.

#### 4.1.2. Efeito dos níveis de 2,4-D e sacarose

Neste ensaio não foi aplicado um novo fator de stresse durante a embriogênese somática em feijoa, contudo foram alterados os níveis de 2,4-D e sacarose durante este processo pois, apesar de servirem como reguladores do crescimento e nutrição para os explantes, também funcionam como fatores stresse (Karami et al. 2006; Karami and Saidi 2010b; Nic-Can and Loyola-Vargas 2016).

Sacarose é a fonte de hidratos de carbono usualmente utilizada em cultura de tecidos vegetais e este grupo de moléculas desempenha funções vitais nas plantas. Adicionalmente, também podem controlar diversos processos de desenvolvimento, mesmo em cascatas de sinalização que controlam a expressão de genes (Satoh et al. 2000; Karami et al. 2006).

A concentração da fonte de carbono (normalmente açúcares) em meio de cultura afeta a formação de embriões somáticos em várias espécies (Biahoua and Bonneau 1999; Fuentes et al. 2000; Nakagawa et al. 2001; Karami et al. 2006). A indução de calos embriogénicos e embriões somáticos pode ser melhorada pela adição de altas concentrações de sacarose, como foi observado na feijoa em estudos anteriores. (Karami et al. 2006) Apesar da sacarose servir como fonte de carbono durante a embriogênese somática, especulasse que altas concentrações de glícidos sejam importantes, não só como fonte de nutrientes, mas também como reguladores osmóticos (Satoh et al. 2000; George et al. 2007). No entanto, é sabido que a presença de altas concentrações de açúcares em meio de cultura tem impacto na osmolaridade celular . Aumentar a concentração de sacarose no meio pode criar stresse osmótico, mas promove a embriogênese somática (Karami et al. 2006). Como a sacarose e glicose são substâncias importantes no metabolismo do carbono, altas concentrações destes compostos podem criar distúrbios no ciclo do carbono que levarão à indução da embriogênese somática nas células (Satoh et al. 2000). O melhoramento da embriogênese somática, resultado de uma alta osmolaridade possivelmente imita as alterações osmóticas que ocorrem durante o desenvolvimento dos embriões zigóticos.

Assim, pode sugerir-se que o efeito osmótico da sacarose pode causar o desenvolvimento normal dos embriões somáticos (Karami et al. 2006).

Considerando os benefícios da utilização de concentrações altas de sacarose em meio de cultura durante a embriogênese somática (também observados em feijoa), seria de esperar que no tratamento de redução de sacarose haveria uma indução de embriões somáticos inferior relativamente ao controlo (Gray et al. 1993; Nakagawa et al. 2001; Karami et al. 2006). Especula-se que as duas semanas iniciais do tratamento, em que todos os explantes partilhavam o mesmo tipo de meio (com 9% de sacarose), tenha sido um intervalo de tempo suficiente para que as condições de nutrição e stresse osmótico no meio de cultura tenham conseguido influenciar a embriogênese somática nos explantes. A partir das 5 semanas, os calos cessaram completamente o desenvolvimento e apresentavam uma coloração escura e castanha, sugerindo a necrose das células (Reis et al. 2008). Este comportamento pode ser explicado por dois fatores. Por um lado, a baixa concentração de sacarose e a presença de 2,4-D no meio (Rahayu et al. 2016). Em estudos feitos noutras espécies, foi observado que um dos efeitos secundários da aplicação de 2,4-D em meio de cultura é a alteração do fenótipo dos calos, transacionando de cores esbranquiçadas para acastanhadas e textura compacta (Rahayu et al. 2016). Isto ocorre provavelmente porque há a acumulação de compostos de fenóis que sofrem a oxidação e polimerização no citoplasma das células e esses produtos resultantes são castanhos ou pretos (Rahayu et al. 2016). Por outro lado, concentrações altas de sacarose em meio de cultura também promovem a redução dos efeitos negativos de quantidades elevadas de 2,4-D (Elmeer 2013). Apesar da concentração de 2,4-D, neste ensaio, não ter sido elevada, a feijoa é uma espécie que naturalmente acumula compostos fenólicos em grandes quantidades e com a redução da concentração de sacarose no meio de cultura, os efeitos negativos do 2,4-D e do metabolismo da feijoa foram mitigados (Harman 1987; Zhu 2018).

As auxinas são PGR essenciais na indução de calos embriogénicos e desenvolvimento posterior (Pasternak et al. 2002b; Nic-Can and Loyola-Vargas 2016). O 2,4-D é uma das auxinas mais eficazes e usadas em estudos de embriogênese somática (Elmeer 2013). Para além de atuar como PGR, também pode agir como um fator de stresse e a sua exposição prolongada causa anomalias nos embriões somáticos (Nic-Can and Loyola-Vargas 2016). Neste ensaio, o 2,4-D foi reduzido ao longo do tempo, tendo em conta esses efeitos negativos.

O modo de regeneração dos explantes parece ser dependente da concentração de 2,4-D no meio de cultura, sendo que altas concentrações induzem a embriogênese, enquanto que concentrações baixas induzem apenas a formação de calos (Elmeer 2013). Contudo, durante as 2 semanas iniciais os meios de cultura tinham a concentração de 2,4-D ideal para induzir

embriogênese somática em feijoa, podendo haver uma influência inicial da auxina. A transferência dos explantes para um meio com concentrações mais baixas ou sem auxina, desacelera o crescimento e prolonga a competência embriogênica. Geralmente, células de crescimento lento retém a sua competência embriogênica durante mais tempo, quando comparadas com células de crescimento rápido (Elmeer 2013). De facto, no final da experiência notou-se que a maioria dos embriões somáticos tinham um tamanho mais pequeno comparativamente aos outros tratamentos. Devido ao seu pequeno tamanho, a presença e quantidade de anomalias no embriões somáticos não foi muito perceptível à lupa, dificultando a comparação com o controlo.

Devido ao lento desenvolvimento dos embriões e também falta aparente de diferenças entre anomalias do tratamento de redução de 2,4-D e do controlo, pode-se concluir que o tratamento executado não é mais eficaz que uma embriogênese somática com exposição a 2,4-D contínuo em feijoa. No entanto, considerando as limitações e resultados do ensaio realizado, outras experiências com redução de auxina poderão ser feitas de outra maneira no futuro, tendo em conta o crescimento dos embriões somáticos e havendo também um maior foco na análise das anomalias.

#### 4.1.3. Efeito do pH dos meios

O crescimento e metabolismo dos explantes pode ser afetado de várias maneiras pelo pH do meio de cultura (Santarem et al. 1997; Pasternak et al. 2002b; Cho et al. 2003). Pode causar efeitos significantes em alguns casos, enquanto noutros, a taxas de crescimento não são afetadas dentro dum intervalo largo de valores de pH, exceto em valores extremos ( $\text{pH} < 3,5$  ou  $\text{pH} > 8,0$ ) (Cho et al. 2003; Hofmann et al. 2004). Estudos noutras espécies, como na cenoura, revelaram que o crescimento de calos foi muito promovido num meio com pH 7,0 (Minocha 1987). Por outro lado, o crescimento e embriogênese das culturas de cenoura foram mais eficientes a pH 5,4. Apesar disso, outro estudo observou que o crescimento das culturas de cenoura não sofria alterações num intervalo de valores de 4,0 a 7,5 (Minocha 1987). Embriões somáticos induzidos num meio com pH baixo, mas que foram desenvolvidos num meio com pH normal demonstraram anomalias nos cotilédones (Cho et al. 2003). No caso da soja, dos pH testados (5,8 e 7,0) na embriogênese somática, os melhores resultados foram observados a pH 7,0 com a produção de um maior número de embriões (Bonacin et al. 2000). As taxas mais elevadas de indução de embriogênese somática a pH 7,0 pode ser resultado duma absorção lenta

e gradual da auxina nos explantes, quando estão inoculados num meio com grandes concentrações de 2,4-D (Santarem et al. 1997; Hofmann et al. 2004).

A absorção de 2,4-D pelas células aumenta com o incremento da acidez do meio e também com o aumento da diferença entre o pH do meio e do citoplasma celular (George et al. 2008). Em vários casos, o pH dos meios acaba por decrescer para valores inferiores a 5,0, levando a um influxo mais rápido das auxinas (Minocha 1987). Num estudo, por exemplo, observou-se que a absorção de 2,4-D em culturas de milho aumentou quando o pH decresceu de 5,5 para 4 (George et al. 2008). No entanto, como consequência, a acumulação excessiva de auxina em condições de cultura pode inibir alguns processos morfogénicos ou levar a efeitos indesejados (Minocha 1987; Nic-Can and Loyola-Vargas 2016). Nos meios mais ácidos não houve uma grande formação de raízes adventícias ou transição da cor dos calos para tons de castanho ou preto, levantando a questão se o pH dos meios ficou constante desde a inoculação dos explantes. As razões que causaram o fraco desenvolvimento dos explantes num meio com pH 5,0 e um maior número de embriões somáticos no meio pH 6,5 não são claras. Da maneira que o pH influencia a absorção de PGR e nutrientes, seria de esperar observar diferenças notáveis nos explantes entre os meios com os valores mais altos ou baixos.

A absorção diferencial de nutrientes, fluxo de  $H^+$ , utilização doutros constituintes do meio e o tipo de células vegetais também podem causar mudanças abruptas do pH (Minocha 1987). Estas mudanças são variáveis, podendo ser ligeiras ou drásticas, acontecendo logo após a inoculação dos explantes ou decorrendo no espaço de alguns dias. O pH final do meio de cultura acaba por ser específico consoante o tipo de tecido ou espécie usada (Hofmann et al. 2004). Por causa destas grandes alterações do pH do meio, muitas das vezes não é possível determinar correlações significativas e/ou confiáveis entre o pH inicialmente definido e o comportamento das células (Minocha 1987). Adicionalmente, também não é possível concluir qual é o melhor pH inicial, quando se testa vários valores, a não ser que o pH dos meios seja constantemente monitorizado ou ajustado (Minocha 1987).

Nesta experiência, o valor pH dos meios não foi analisado após a autoclavagem e desde esse momento podem ter ocorrido alterações do pH dos meios. Para além disso, como foi referido anteriormente, desde a inoculação dos explantes, os meios de cultura podem ter sofrido alterações do pH devido ao metabolismo dos explantes. Como o pH dos meios pode ter mudado durante a experiência e os valores não foram monitorizados, os resultados obtidos não são confiáveis, podendo não representar o verdadeiro comportamento dos explantes face a diferentes valores de pH.

#### 4.1.4. Efeito do stresse oxidativo

Espécies reativas de oxigénio foram reconhecidos como reguladores essenciais do crescimento e desenvolvimento das plantas. ROS demonstram uma função dupla em vários processos de desenvolvimento que dependem do nível e distribuição no interior da célula (Zhou et al. 2016a). Um aumento de ROS pode causar danos na célula, especialmente em biomoléculas como o DNA, proteínas e lípidos, reagir com a membrana plasmática e a altos níveis de ROS pode ocorrer a necrose ou apoptose (Rose et al. 2013; Prudente et al. 2020). Por outro lado, em concentrações ideais, os ROS podem funcionar como moléculas sinalizadoras, estimulando os fatores de transcrição, genes de defesa, causar respostas adaptativas e induzir embriogénese somática (Zhou et al. 2016a; Prudente et al. 2020).

Fatores de stresse ou a sinalização por ROS têm de interagir com vias de sinalização hormonal para promover desdiferenciação, reentrada no ciclo celular e a organogénese necessária para embriogénese somática (Zhou et al. 2016a). Estudos recentes revelam as interações entre ROS e sinais hormonais durante o desenvolvimento. As auxinas interagem com ROS para controlar diversos aspetos do crescimento e desenvolvimento das plantas (Rose et al. 2013; Zhou et al. 2016a). Por exemplo, estudos revelaram que o 2,4-D e ROS melhoram a ativação da divisão celular em paralelo com mecanismos de defesa celular (Pasternak et al. 2007). Como as auxinas e as vias de sinalização de stresse oxidativo cooperam para ativar a reentrada no ciclo celular continua incerto, acompanhado pelo facto de que a diferenciação celular acompanha a reentrada no ciclo celular (Berckmans et al. 2011; Rose et al. 2013; Zhou et al. 2016a). Pensasse que a ativação paralela de auxina e sinalização de stresse pode ser um evento importante na adaptação celular, reprogramando a padrões de expressão de genes, metabolismo e fisiologia celular, resultando na aquisição de totipotência e competência embriogénica das células somáticas das plantas (Zavattieri et al. 2010). Um número crescente de publicações associa ROS com a indução da embriogénese somática, sugerindo que a indução do stresse oxidativo nos explantes em cultura pode causar a desdiferenciação das células (Prudente et al. 2020).

O peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) é um agente oxidativo fraco entre as outras espécies reativas de oxigénio devido à sua lenta decomposição. Este ROS pode ser produzido por vários tipos de células e exibe uma habilidade de rapidamente penetrar as membranas celulares. Devido a estas características,  $H_2O_2$  pode funcionar como um mensageiro secundário,

amplificando sinalização intracelular para a ativação do ciclo celular, induzindo a expressão de genes e a síntese de proteínas necessárias para regular as vias morfogênicas e produção de embriões somáticos (Prudente et al. 2020). Há um efeito duplo pela suplementação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em meio de cultura, por um lado concentrações baixas em meio de cultura melhoram a embriogênese, enquanto valores mais elevados inibem a embriogênese (Zhang et al. 2015). Em *Lycium barbarum*, a frequência da embriogênese somática atingiu o seu valor máximo no meio suplementado com 200 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kairong et al. 1999). Uma concentração de 100 µM aumentou o número de embriões somáticos em cerca de 20% e a adição de 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentou o número em cerca de 100%. Concentrações mais elevadas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (300 µM) inibiram a formação de embriões somáticos (Kairong et al. 1999). Em duas espécies de *Picea*, a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ao meio promoveu o desenvolvimento do tecido embriogênico e o posterior desenvolvimento de embriões somáticos (Hazubska-Przybył et al. 2020). Noutro estudo, tratamentos de 100-300 µmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em cotilédones de *Fraxinus mandshurica* promoveu a embriogênese somática dentro de 30 dias. No entanto, a capacidade do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para promover a embriogênese somática diminuiu ao longo do tempo (Yang et al. 2021). Adicionalmente, tratamentos em bananeira (*Musa* spp.) e na planta do algodão (*Gossypium* spp.) (Ganesan and Jayabalan 2004; Ma et al. 2012; Cheng et al. 2015; Zhou et al. 2016b).

Nos estudos referidos anteriormente, o stresse oxidativo foi induzido pela adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ao meio de cultura e os explantes estiveram em exposição prolongada, demonstrando efeitos positivos do stresse oxidativo (especialmente em plantas lenhosas) (Kairong et al. 1999; Hazubska-Przybył et al. 2020; Yang et al. 2021). No entanto, no ensaio executado para esta dissertação foram feitos choques de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Não houve diferenças significativas no número de embriões somáticos induzidos e o desenvolvimento foi semelhante em todos os explantes até ao final da experiência, exceto em alguns explantes inoculados no meio do choque de 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que não germinaram. Apesar de ser uma espécie reativa de oxigênio fraca, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> demonstrou a capacidade de impedir a germinação de alguns embriões zigóticos, provavelmente ao induzir a necrose ou apoptose das células destes (Rose et al. 2013). Provavelmente o curto espaço de tempo em que os explantes foram submetidos ao stresse oxidativo não foi suficiente para induzir vias de sinalização para a desdiferenciação celular, que poderiam levar a um processo de embriogênese somática mais eficaz ou precoce, acabando por apenas ativar respostas de defesa com a produção de compostos antioxidantes (Cassells and Curry 2001; Cho et al. 2003).

#### 4.1.5. Tratamento com NaCl

Estudos anteriores testaram o efeito do cloreto de sódio (NaCl) na multiplicação de tecidos e indução da embriogênese somática (Galiba and Yamada 1988; Ben-Hayyim and Goffer 1989; Hossain et al. 2007). O stresse osmótico causado por manitol ou por NaCl revelou ser um fator importante para o condicionamento da embriogênese somática em estudos com o híbrido *Carica papaya* X *C. cauliflora* (Elmeer 2013). Exposição inicial das culturas embriogênicas com NaCl e manitol seguido da transferência para meios com osmolaridade mais baixa duplicou a eficácia da embriogênese somática comparativamente a culturas sem o tratamento (Sabbah and Tal 1990). A presença de NaCl durante a embriogênese da espécie *Citrus sinensis* afeta o equilíbrio de reguladores de crescimento normal (Ben-Hayyim and Goffer 1989). Inicialmente, o NaCl consegue substituir a função de citocininas ou ABA na síntese de clorofila e aumenta a necessidade de ácido giberélico para uma formação da fase cordiforme na embriogênese (Ben-Hayyim and Goffer 1989). A troca com o ácido ABA pode ser explicada num princípio de aumento dos níveis endógenos desta fitohormona induzidos por NaCl (Ben-Hayyim and Goffer 1989). A frequência da formação de embriões somáticos no trigo aumentou com o incremento das concentrações de NaCl com uma taxa máxima de indução a 40mM (Elmeer 2013). No entanto, em concentrações excessivas (170mM), a indução de calos e o crescimento de calos primários foi suprimida. Adicionalmente, NaCl suprimiu a diferenciação do meristema apical, mas não preveniu o crescimento dos embriões somáticos. Em cultivares de arroz, o NaCl diminuiu bastante a frequência de regeneração mas aumentou ligeiramente a taxa de sobrevivência das plântulas regeneradas (Elmeer 2013).

No ensaio executado para esta dissertação nenhum dos explantes sobreviveu, incluindo os controlos. Isto pode significar que as concentrações de NaCl utilizadas foram de tal forma elevadas que provocaram a senescência dos explantes.

#### 4.6. Análise fenotípica

Em feijoa, os embriões somáticos induzidos têm uma grande tendência para desenvolver anomalias fenotípicas (Canhoto et al. 1999b, 2009). Desde os primeiros estudos de embriogênese somática nesta espécie que se notou esta tendência (Cruz et al. 1990). Nessas

observações, as anomalias mais comuns foram fusão de embriões, cotilédones extranumerários ou fusão dos cotilédones (Cruz et al. 1990; Pescador et al. 2008; Canhoto et al. 2009). Neste estudo, para além das anomalias observadas anteriormente, também se registou cotilédones ausentes ou pouco desenvolvidos e germinação precoce. Normalmente, concentrações elevadas de 2,4-D durante a indução diminuem a germinação precoce dos embriões somáticos, mas em feijoa a concentração de 2,4-D normalmente usada é considerada baixa, explicando este desenvolvimento ter também acontecido no controlo (Baker and Wetzstein 1994).

Certas anomalias presentes nos embriões somáticos de feijoa apresentam semelhanças com os fenótipos de mutantes em *Arabidopsis* (Mayer et al. 1991; Torres-Ruiz et al. 1996; Richter et al. 2010). Mutantes *gnom* de *Arabidopsis* são caracterizados por um grau variado de planos de divisão celular inclinados, causados pela falta de distribuição polar de auxina que iria definir os ápices (Mayer et al. 1991; Pescador et al. 2008). Demonstram alterações fenotípicas na embriogénese, não ocorrendo desenvolvimento de ambas regiões apicais do embrião e estes acabam por ficar com uma forma esférica ou cónica (Richter et al. 2010). Por outro lado, o mutante *gurke* leva apenas à ausência dos cotilédones, mas em alelos fracos podem desenvolver pequenas protuberâncias podendo representar cotilédones incipientes (Torres-Ruiz et al. 1996; Pescador et al. 2008). *CUP-SHAPED COTYLEDON 1 (CUC1)* e *2 (CUC2)*, são dois genes redundantes necessários para a separação dos cotilédones no início da sua formação e também para a formação dum meristema apical do caule funcional (Aida et al. 1999). A ocorrência de diferentes planos de divisão celular nas células embriogénicas dos explantes de feijoa, parece refletir a perturbação da polaridade celular, podendo ser este o mecanismo envolvido na formação de embriões somáticos anómalos (Pescador et al. 2008; Cristofolini et al. 2014).

Vários outros fatores podem causar as alterações estruturais observadas durante a embriogénese somática em feijoa (Fraga et al. 2013; Cristofolini et al. 2014). Os calos são uma fonte de alteração genética devido à sua origem a partir de diferentes tecidos e tendência para mixoploidia e em feijoa o processo de embriogénese somática decorre pela via indireta e formação de calos antes da indução de embriões somáticos (Pescador et al. 2008; Cristofolini et al. 2014). Outra hipótese propôs que a origem multicelular dos embriões somáticos em feijoa também estaria relacionada com o desenvolvimento de anomalias (Canhoto and Cruz 1996b; Pescador et al. 2008).

O desenvolvimento de anomalias em embriões somáticos é frequentemente relacionado com o uso de 2,4-D no meio de cultura na regeneração de plantas (Garcia et al. 2019; Bidabadi and Mohan Jain 2020). É muito provável que a exposição prolongada a 2,4-D em cultura tenha efeitos negativos nos processos genéticos e fisiológicos dos explantes de feijoa. Pensa-se que o

2,4-D gera uma ativação de stresse que permite induzir a embriogénese somática, mas também foi proposto que o efeito embriogénico do 2,4-D deriva da sua ação de induzir a metilação de DNA nuclear (Pescador et al. 2008). De facto, julgasse que a metilação de DNA é um processo indispensável para iniciar a embriogénese somática, mas como consequência, também pode induzir variações somaclonais, que conseguem persistir nas plantas regeneradas e ser transmitidas para a próxima geração (Garcia et al. 2019; Bidabadi and Jain 2020). Para muitas espécies, o uso quase obrigatório de 2,4-D (para induzir embriogénese somática), uso de explantes polissomáticos em vez de meristemáticos e a fase de formação de calos da via indireta embriogénese somática parecem serem os principais fatores que induzem o desenvolvimento de anomalias em embriões somáticos (Pescador et al. 2008). Assim, é necessário explorar diferentes metodologias para minimizar os efeitos negativos da utilização de protocolos convencionais de embriogénese somática.

## 5. Conclusão e perspectivas futuras

---





A feijoa é uma boa candidata para o cultivo e comercialização internacional e diversos estudos já foram feitos nesta espécie para criar protocolos de clonagem eficazes através da embriogénese somática. Uma das maiores limitações do processo de embriogénese somática em feijoa é o desenvolvimento de anomalias nos embriões somáticos, causadas por uma exposição prolongada a 2,4-D.

Neste trabalho foram aplicados diferentes fatores de stresse para analisar o seu efeito na indução de embriogénese somática em feijoa. Infelizmente, nenhum dos fatores de stresse testados demonstrou induzir, só por si, a embriogénese somática ou potenciar a sua expressão. Contudo, reconheceu-se que algumas das metodologias usadas não foram as mais eficientes. Outros estudos obtiveram resultados positivos em plantas lenhosas usando os mesmos fatores de stresse, mas com outros métodos. Adotar estas metodologias em ensaios futuros na feijoa poderá revelar outros resultados ou consolidar a ineficácia dos fatores de stresse testados neste trabalho.

O fenótipo dos embriões somáticos também foi avaliado. A exposição contínua do 2,4-D levou a que a maioria dos explantes se desenvolve anomalias. No entanto, estas deformações físicas exibem semelhanças com mutantes de *Arabidopsis*. Estes paralelos são importantes, pois a compreensão da fisiologia dos embriões mutantes em *Arabidopsis* poderá levar a um melhor entendimento dos processos biológicos por detrás do desenvolvimento anómalo de embriões somáticos em feijoa. Desta forma, poderão ser criadas metodologias que mitiguem o desenvolvimento de anomalias na embriogénese somática de feijoa, baseadas nos processos biológicos em *Arabidopsis*.

## **6. Referências bibliográficas**

---

- Aida M, Ishida T, Tasaka M (1999) Shoot apical meristem and cotyledon formation during *Arabidopsis* embryogenesis: interaction among the *CUP-SHAPED COTYLEDON* and *SHOOT MERISTEMLESS* genes. *Development* 126:1563–1570.  
<https://doi.org/10.1242/dev.126.8.1563>
- Akhtar N (2010) Evaluation of the efficiency of somatic embryogenesis in guava (*Psidium guajava* L.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 85:556–562.  
<https://doi.org/10.1080/14620316.2010.11512714>
- Amarante CVT, Santos K (2011) Feijoa (*Acca sellowiana*). *Revista Brasileira de Fruticultura* 33:1.
- Baker CM, Wetzstein HY (1994) Influence of auxin type and concentration on peanut somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36:361–368.  
<https://doi.org/10.1007/BF00046094>
- Ballester A, Corredoira E, Vieitez AM (2016) Limitations of somatic embryogenesis in hardwood trees. In: *Vegetative Propagation of Forest Trees*. pp 56–74.
- Ben-Hayyim G, Goffer Y (1989) Plantlet regeneration from a NaCl-selected salt-tolerant callus culture of Shamouti orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Plant Cell Reports* 7:680–683. <https://doi.org/10.1007/BF00272060>
- Berckmans B, Vassileva V, Schmid SPC, et al (2011) Auxin-Dependent cell cycle reactivation through transcriptional regulation of *Arabidopsis* E2Fa by lateral organ boundary proteins. *Plant Cell* 23:3671–3683. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.088377>
- Bhatia S, Bera T (2015) Somatic Embryogenesis and Organogenesis. In: Bhatia S, Dahiya R, Sharma K, Bera T (eds) *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*. Elsevier, London, pp 209–230.
- Bhatia S, Sharma K (2015) Micropropagation. In: Bhatia S, Dahiya R, Sharma K, Bera T (eds) *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*. Elsevier, London, pp 361–368.
- Bhatia S, Sharma K, Dahiya R, Bera T (2015) *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*. Elsevier, London

- Bhojwani SS, Mullins K, Cohen D (1987) Micropropagation of *Feijoa sellowiana* Berg. *Acta Horticulturae* 69–76. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1987.212.8>
- Biahoua A, Bonneau L (1999) Control of in vitro somatic embryogenesis of the spindle tree (*Euonymus europaeus* L.) by the sugar type and the osmotic potential of the culture medium. *Plant Cell Reports* 19:185–190. <https://doi.org/10.1007/s002990050731>
- Bidabadi SS, Jain SM (2020) Cellular, Molecular, and Physiological Aspects of In Vitro Plant Regeneration. *Plants* 9:702. <https://doi.org/10.3390/plants9060702>
- Bidabadi SS, Mohan Jain S (2020) Cellular, molecular, and physiological aspects of in vitro plant regeneration. *Plants* 9:10–13.
- Bloch R (1941) Wound healing in higher plants. *Botanical Review* 7:110–146. <https://doi.org/10.1007/BF02872446>
- Bloch R (1952) Wound healing in higher plants. II. *Botanical Review* 18:655–679. <https://doi.org/10.1007/BF02957556>
- Boldaji HN, Dylami SD, Aliniaiefard S, Norouzi M (2021) Efficient method for direct embryogenesis in *Phalaenopsis* orchid. *International Journal of Horticultural Science and Technology* 9:37–50. <https://doi.org/10.22059/ijhst.2020.296696.339>
- Bonacin GA, Di Mauro AO, Oliveira RC De, Perecin D (2000) Induction of somatic embryogenesis in soybean: physicochemical factors influencing the development of somatic embryos. *Genetics and Molecular Biology* 23:865–868. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572000000400027>
- Bonga JM, Durzan DJ (1982) *Tissue Culture in Forestry*. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Bonga JM, Durzan DJ (1987) *Cell and Tissue Culture in Forestry*. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Cangahuala-Inocente GC, Steiner N, Santos M, Guerra MP (2004a) Morphohistological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. *Protoplasma* 224:33–40. <https://doi.org/10.1007/s00709-004-0055-5>
- Cangahuala-Inocente GC, Steiner N, Santos M, Guerra MP (2004b) Morphohistological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. *Protoplasma* 224:33–40. <https://doi.org/10.1007/s00709-004-0055-5>

- Canhoto J, Correia S, Marques C (2009) Factors affecting somatic embryogenesis induction and development in *Feijoa sellowiana* Berg. *Acta Horticulturae* 839:147–156.  
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.839.17>
- Canhoto J, Cruz G (1996a) *Feijoa sellowiana* Berg (Pineapple Guava). In: Bajaj YPS (ed) *Trees IV. Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer, Berlin, pp 155–171.
- Canhoto J, Cruz G (1996b) Histodifferentiation of somatic embryos in cotyledons of pineapple guava (*Feijoa sellowiana* Berg). *Protoplasma* 191:34–45.  
<https://doi.org/10.1007/BF01280823>
- Canhoto J, Cruz G (2000) Micropropagation of pineapple guava through organogenesis and axillary shoot proliferation. *Acta Horticulturae* 520:109–118.  
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2000.520.11>
- Canhoto J, Lopes M, Cruz G (1999a) Somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle (Myrtaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 57:13–21.  
<https://doi.org/10.1023/A:1006273128228>
- Canhoto J, Lopes M, Cruz G (1999b) Somatic embryogenesis in myrtaceous plants. In: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (eds) *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Forestry Sciences. Springer, Dordrecht, pp 293–340.
- Canhoto JM (2010) *Biotecnologia vegetal: da clonagem de plantas à transformação genética*. Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Cassells AC, Curry RF (2001) Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: Implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64:145–157.  
<https://doi.org/10.1023/A:1010692104861>
- Chen L, Sun B, Xu L, Liu W (2016) Wound signaling: The missing link in plant regeneration. *Plant Signaling & Behavior* 11:e1238548.  
<https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1238548>
- Cheng W-H, Wang F-L, Cheng X-Q, et al (2015) Polyamine and Its Metabolite H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Play a Key Role in the Conversion of Embryogenic Callus into Somatic Embryos in Upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Frontiers in Plant Science* 6:1063.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01063>

- Cho DY, Lee EK, Lee S, et al (2003) Enhanced somatic embryogenesis and plant regeneration in leaf explant cultures of *Ostericum koreanum* on medium of varying pH. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 75:215–222.  
<https://doi.org/10.1023/A:1025824904491>
- Corredoira E, Merkle S, Martínez M, et al (2019) Non-Zygotic Embryogenesis in Hardwood Species. *Critical Reviews in Plant Sciences* 38:29–97.  
<https://doi.org/10.1080/07352689.2018.1551122>
- Correia S, Alves A, Veríssimo P, Canhoto J (2016) Somatic Embryogenesis in Broad-Leaf Woody Plants: What We Can Learn from Proteomics. In: Germana M, Lambardi M (eds) *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, New York, pp 117–129.
- Cristofolini C, do Nascimento Vieira L, de Freitas Fraga HP, et al (2014) DNA methylation patterns and karyotype analysis of off-type and normal phenotype somatic embryos of feijoa. *Theoretical and Experimental Plant Physiology* 26:217–224.  
<https://doi.org/10.1007/s40626-014-0020-4>
- Cruz G, Canhoto J, Abreu M (1990) Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of *Feijoa sellowiana* berg. *Plant Science* 66:263–270.  
[https://doi.org/10.1016/0168-9452\(90\)90212-7](https://doi.org/10.1016/0168-9452(90)90212-7)
- Dal Vesco LL, Guerra MP (2001) The effectiveness of nitrogen sources in Feijoa somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64:19–25.  
<https://doi.org/10.1023/A:1010635926146>
- Delessert C, Wilson I, Van Der Straeten D, et al (2004) Spatial and temporal analysis of the local response to wounding. *Plant Molecular Biology* 55:165–181.  
<https://doi.org/10.1007/s11103-004-0112-7>
- Dettori MT, Gaetano R Di (1991) *Feijoa sellowiana* : floral biology. *Advances in Horticultural Science* 5:11–14.
- Dudits D, Györgyey J, Bögre L, Bakó L (1995) Molecular Biology of Somatic Embryogenesis. In: Thorpe TA (ed) *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. Springer, Dordrecht, pp 267–308.
- Dunstan DI, Tautorius TE, Thorpe TA (1995) Somatic Embryogenesis in Woody Plants. In: Thorpe TA (ed) *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Current Plant Science and

- Biotechnology in Agriculture. Springer, Dordrecht, pp 471–538.
- Elmeer K (2013) Factors regulating somatic embryogenesis in plants. In: Aslam J, Srivastava PS, Sharma MP (eds) Somatic embryogenesis and gene expression. Narosa Publishing House, New Delhi, pp 56–79.
- Fehér A (2019) Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: What these terms mean in the era of molecular plant biology? *Frontiers in Plant Science* 10:1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536>
- Fehér A (2015) Somatic embryogenesis - stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 1849:385–402. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.07.005>
- Fraga HPF, Agapito-Tenfen SZ, Caprestano CA, et al (2013) Comparative proteomic analysis of off-type and normal phenotype somatic plantlets derived from somatic embryos of Feijoa (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret). *Plant Science* 210:224–231. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.06.006>
- Fuentes SRL, Calheiros MBP, Manetti-Filho J, Vieira LGE (2000) The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 60:5–13. <https://doi.org/10.1023/A:1006474324652>
- Galiba G, Yamada Y (1988) A novel method for increasing the frequency of somatic embryogenesis in wheat tissue culture by NaCl and KCl supplementation. *Plant Cell Reports* 7:55–58. <https://doi.org/10.1007/BF00272978>
- Ganesan M, Jayabalan N (2004) Evaluation of haemoglobin (erythrocyte): For improved somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR 2). *Plant Cell Reports* 23:181–187. <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0822-y>
- Garcia C, Furtado de Almeida AA, Costa M, et al (2019) Abnormalities in somatic embryogenesis caused by 2,4-D: an overview. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 137:193–212. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01569-8>
- George EF, Hall MA, Klerk GJ De (2007) *Plant Propagation by Tissue Culture*, 3rd edn. Springer Netherlands, Dordrecht.
- George EF, Hall MA, Klerk GJ De (2008) The components of plant tissue culture media II: Organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. *Plant Propagation by*

- Tissue Culture 3rd Edition 1:115–173. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_4)
- Gray DJ, McColley DW, Compton ME (1993) High-frequency Somatic Embryogenesis from Quiescent Seed Cotyledons of *Cucumis melo* Cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 118:425–432. <https://doi.org/10.21273/JASHS.118.3.425>
- Guerra MP, Dal Vesco LL, Ducroquet JPHJ, et al (2001) Somatic embryogenesis in goiabeira serrana: Genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 13:117–128. <https://doi.org/10.1590/S0103-31312001000200001>
- Guerra MP, Pescador R, Dal Vesco LL, et al (1997) In vitro morphogenesis in *Feijoa sellowiana*: somatic embryogenesis and plant regeneration. *Acta Horticulturae* 27–36. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1997.452.4>
- Gulzar B, Mujib A, Malik MQ, et al (2020) Genes, proteins and other networks regulating somatic embryogenesis in plants. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 18:1–15.
- Hammatt N (1992) Progress in the biotechnology of trees. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 8:369–377.
- Harman JE (1987) Feijoa fruit: Growth and chemical composition during development. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture* 15:209–215. <https://doi.org/10.1080/03015521.1987.10425561>
- Hassan SAM, Zayed NS (2018) Factor Controlling Micropropagation of Fruit Trees: A Review. *Science International* 6:1–10. <https://doi.org/10.17311/sciintl.2018.1.10>
- Hazubska-Przybył T, Ratajczak E, Obarska A, Pers-Kamczyc E (2020) Different Roles of Auxins in Somatic Embryogenesis Efficiency in Two *Picea* Species. *International Journal of Molecular Sciences* 21:3394. <https://doi.org/10.3390/ijms21093394>
- Hofmann N, Nelson RL, Korban SS (2004) Influence of media components and pH on somatic embryo induction in three genotypes of soybean. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77:157–163. <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000016819.74630.59>
- Hossain Z, Mandal AKA, Datta SK, Biswas AK (2007) Development of NaCl-tolerant line in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. through shoot organogenesis of selected callus line. *Journal of Biotechnology* 129:658–667. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.02.020>

- Ikeuchi M, Iwase A, Rymen B, et al (2017) Wounding triggers callus formation via dynamic hormonal and transcriptional changes. *Plant Physiology* 175:1158–1174.  
<https://doi.org/10.1104/pp.17.01035>
- Ikeuchi M, Rymen B, Sugimoto K (2020) How do plants transduce wound signals to induce tissue repair and organ regeneration? *Current Opinion in Plant Biology* 57:72–77.  
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.06.007>
- Ikeuchi M, Sugimoto K, Iwase A (2013) Plant callus: Mechanisms of induction and repression. *Plant Cell* 25:3159–3173. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.116053>
- Jiménez VM (2005) Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation* 47:91–110.  
<https://doi.org/10.1007/s10725-005-3478-x>
- Kairong C, Gengsheng X, Xinmin L, et al (1999) Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. *Plant Science* 146:9–16.  
[https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00087-4](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00087-4)
- Kamle M, Baek KH (2017) Somatic embryogenesis in guava (*Psidium guajava* L.): current status and future perspectives. *3 Biotech* 7:1–11. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0844-0>
- Karami O, Aghavaisi B, Mahmoudi Pour A (2009) Molecular aspects of somatic-to-embryogenic transition in plants. *Journal of Chemical Biology* 2:177–190.  
<https://doi.org/10.1007/s12154-009-0028-4>
- Karami O, Deljou A, Esna-Ashari M, Ostad-Ahmadi P (2006) Effect of sucrose concentrations on somatic embryogenesis in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Scientia Horticulturae* 110:340–344. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.07.029>
- Karami O, Saidi A (2010a) The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. *Molecular Biology Reports* 37:2493–2507.  
<https://doi.org/10.1007/s11033-009-9764-3>
- Karami O, Saidi A (2010b) The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. *Molecular Biology Reports* 37:2493–2507.  
<https://doi.org/10.1007/s11033-009-9764-3>
- Kaur R, Kapoor M (2016) *Plant Regeneration Through Somatic Embryogenesis in Sugarcane*.

- Sugar Tech 18:93–99. <https://doi.org/10.1007/s12355-015-0380-3>
- Komamine A, Kawahara R, Matsumoto M, et al (1992) Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: Physiology, biochemistry, and molecular biology. In *Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 28:11–14. <https://doi.org/10.1007/BF02632185>
- Kumlay AM, Ercisli S (2015) Callus induction, shoot proliferation and root regeneration of potato (*Solanum tuberosum* L.) stem node and leaf explants under long-day conditions. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 29:1075–1084. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1077685>
- Lambardi M, National I, Jain SM (2013) *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants*. Humana Press, Totowa, NJ.
- Lane WD (1979) Regeneration of pear plants from shoot meristem-tips. *Plant Science Letters* 16:337–342. [https://doi.org/10.1016/0304-4211\(79\)90046-4](https://doi.org/10.1016/0304-4211(79)90046-4)
- Lim TK (2012) *Edible Medicinal and Non Medicinal Plants: Volume 3, Fruits*. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Long LM, Preece JE, Van Sambeek JW (1995) Adventitious regeneration of *Juglans nigra* L. (eastern black walnut). *Plant Cell Reports* 14:799–803. <https://doi.org/10.1007/BF00232926>
- Ma L, Xie L, Lin G, et al (2012) Histological changes and differences in activities of some antioxidant enzymes and hydrogen peroxide content during somatic embryogenesis of *Musa AAA* cv. Yueyoukang 1. *Scientia Horticulturae* 144:87–92. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.06.039>
- Martínez MT, San-José M del C, Arrillaga I, et al (2019) Holm Oak Somatic Embryogenesis: Current Status and Future Perspectives. *Frontiers in Plant Science* 10:239:1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00239>
- Mayer U, Ruiz RAT, Berleth T, et al (1991) Mutations affecting body organization in the *Arabidopsis* embryo. *Nature* 353:402–407. <https://doi.org/10.1038/353402a0>
- Méndez-Hernández HA, Ledezma-Rodríguez M, Avilez-Montalvo RN, et al (2019) Signaling overview of plant somatic embryogenesis. *Frontiers in Plant Science* 10:1–15.

- Minocha SC (1987) pH of the medium and the growth and metabolism of cells in culture. In: Bonga JM, Durzan DJ (eds) Cell and Tissue Culture in Forestry. Forestry Sciences. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 125–141
- Mitra SK, Irenaues TKS, Gurung MR, Pathak PK (2012) Taxonomy and importance of Myrtaceae. *Acta Horticulturae* 959:23–34.  
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.959.2>
- Mordhorst AP, Toonen MAJ, de Vries SC, Meinke D (1997) Plant Embryogenesis. *Critical Reviews in Plant Sciences* 16:535–576. <https://doi.org/10.1080/07352689709701959>
- Murashige T, Skoog F (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473–497.  
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nakagawa H, Saijyo T, Yamauchi N, et al (2001) Effects of sugars and abscisic acid on somatic embryogenesis from melon (*Cucumis melo* L.) expanded cotyledon. *Scientia Horticulturae* 90:85–92. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(00\)00259-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(00)00259-4)
- Nasef N, Mehta S, Murray P, et al (2014) Anti-Inflammatory Activity of Fruit Fractions in Vitro, Mediated through Toll-Like Receptor 4 and 2 in the Context of Inflammatory Bowel Disease. *Nutrients* 6:5265–5279. <https://doi.org/10.3390/nu6115265>
- Nelson T, Gandotra N, Tausta SL (2008) Plant cell types: reporting and sampling with new technologies. *Current Opinion in Plant Biology* 11:567–73.  
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.06.006>
- Nic-Can GI, Loyola-Vargas VM (2016) The Role of the Auxins During Somatic Embryogenesis. In: Loyola-Vargas V, Ochoa-Alejo N (eds) Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications. Springer, Cham, pp 171–182.
- Ultramari AC, Dal Vesco LL, Pedrotti EL, et al (2000) Protocolo de micropropagação da goiabeira serrana (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). *Ciência Rural* 30:61–68.  
<https://doi.org/10.1590/s0103-84782000000100010>
- Pais MS (2019) Somatic Embryogenesis Induction in Woody Species: The Future After OMICs Data Assessment. *Frontiers in Plant Science* 10:.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00240>
- Pasternak TP, Ötvös K, Domoki M, Fehér A (2007) Linked activation of cell division and

- oxidative stress defense in alfalfa leaf protoplast-derived cells is dependent on exogenous auxin. *Plant Growth Regulation* 51:109–117. <https://doi.org/10.1007/s10725-006-9152-0>
- Pasternak TP, Prinsen E, Ayaydin F, et al (2002a) The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Physiology* 129:1807–1819. <https://doi.org/10.1104/pp.000810>
- Pasternak TP, Prinsen E, Ayaydin F, et al (2002b) The Role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant physiology* 129:1807–19. <https://doi.org/10.1104/pp.000810>
- Pavei AF, Fraga HPF, Vieira LN, Guerra MP (2018) Effects of glutathione supplementation and carbon source during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana* (O.Berg) burret (Myrtaceae). *Acta Scientiarum - Biological Sciences* 40:1–8. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v40i1.40257>
- Pereira ASS (2016) Micropropagação de *Acca Sellowiana* (Berg.): Optimização da indução de embriogênese somática e estabeleciment de novos genótipos. Tese de Mestrado, Universidade de Coimbra.
- Pescador R, Kerbauy GB, Viviani D, Kraus JE (2008) Anomalous somatic embryos in *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 31:155–164. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042008000100014>
- Pinto G, Park YS, Silva S, et al (2008) Factors affecting maintenance, proliferation, and germination of secondary somatic embryos of *Eucalyptus globulus* Labill.: Basal medium and anti-browning agents. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 95:69–78. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9417-6>
- Prammanee S, Thumjamras S, Chiemsombat P, Pipattanawong N (2011) Efficient shoot regeneration from direct apical meristem tissue to produce virus-free purple passion fruit plants. *Crop Protection* 30:1425–1429. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.07.008>
- Prudente D de O, de Souza LB, Paiva R (2020) Plant Somatic Embryogenesis: Modulatory Role of Oxidative Stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences* 90:483–487. <https://doi.org/10.1007/s40011-019-01136-3>

- Quiroz-Figueroa FR, Rojas-Herrera R, Galaz-Avalos RM, Loyola-Vargas VM (2006) Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 86:285–301.  
<https://doi.org/10.1007/s11240-006-9139-6>
- Rahayu S, Roostika I, Bermawie N (2016) The effect of types and concentrations of auxins on callus induction of *Centella asiatica*. *Nusantara Bioscience* 8:283–287.  
<https://doi.org/10.13057/nusbiosci/n080224>
- Ramírez F, Kallarackal J (2017) Feijoa [*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret] pollination: A review. *Scientia Horticulturae* 226:333–341.  
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.08.054>
- Reis E, Batista M, Canhoto J (2008) Effect and analysis of phenolic compounds during somatic embryogenesis induction in *Feijoa sellowiana* Berg. *Protoplasma* 232:193–202.  
<https://doi.org/10.1007/s00709-008-0290-2>
- Richter S, Anders N, Wolters H, et al (2010) Role of the *GNOM* gene in Arabidopsis apical-basal patterning – From mutant phenotype to cellular mechanism of protein action. *European Journal of Cell Biology* 89:138–144.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2009.11.020>
- Rojas-Herrera R, Loyola-Vargas VM (2002) Induction of a class III acidic chitinase in foliar explants of *Coffea arabica* L. during somatic embryogenesis and wounding. *Plant Science* 163:705–711. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00156-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00156-5)
- Rose RJ, Sheahan MB, Tiew TW-Y (2013) Connecting stress to development in the induction of somatic embryogenesis. In: Aslam J, Srivastava PS, Sharma MP (eds) *Somatic Embryogenesis and Gene Expression*. Narosa Publishing House, New Delhi, pp 146–165
- Ross S, Pechi E, Speroni G, et al (2017) In vitro rooting of *Acca sellowiana* microshoots. *Acta Horticulturae* 1155:537–541. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1155.79>
- Sabbah S, Tal M (1990) Development of callus and suspension cultures of potato resistant to NaCl and mannitol and their response to stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 21:119–128. <https://doi.org/10.1007/BF00033430>
- Sang YL, Cheng ZJ, Zhang XS (2018) Plant stem cells and de novo organogenesis. *New Phytologist* 218:1334–1339. <https://doi.org/10.1111/nph.15106>

- Santarem ER, Pelissier B, Finer JJ (1997) Effect of explant orientation, pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos. In *Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 33:13–19. <https://doi.org/10.1007/s11627-997-0034-6>
- Satoh K, Ooka H, Wakai A, et al (2000) Osmotic and Non-osmotic Induction of Somatic Embryogenesis by Sucrose at High Concentrations in *Daucus carota* L. *Plant Biotechnology* 17:155–158
- 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* 7:307–311. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032007000200035>
- Schenk RU, Hildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany* 50:199–204. <https://doi.org/10.1139/b72-026>
- Schotsmans WC, East A, Thorp G, Woolf AB (2011) *Feijoa (Acca sellowiana [Berg] Burret)*. Woodhead Publishing Limited.
- Sharpe RH, Sherman WB, Miller EP (1994) *Feijoa* history and improvement. *Florida State Horticultural Society* 106:134–139
- Stefanello S, Dal Vesco LL, Ducroquet JPHJ, et al (2005) Somatic embryogenesis from floral tissues of feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg). *Scientia Horticulturae* 105:117–126. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2004.11.006>
- Stefenon VM, Ree JF, Pinheiro MVM, et al (2020) Advances and constraints in somatic embryogenesis of *Araucaria angustifolia*, *Acca sellowiana*, and *Bactris gasipaes*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 143:241–263. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01928-w>
- Stewart AM, Craig JL (1989) Factors affecting pollinator effectiveness in *Feijoa sellowiana*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 17:145–154. <https://doi.org/10.1080/01140671.1989.10428023>
- Sudheer WN, Praveen N, Al-Khayri JM, Jain SM (2022) Role of plant tissue culture medium components. In: Rai AC, Modi A, Kumar A, Singh M (eds) *Advances in Plant Tissue Culture*. Elsevier, London, pp 51–83.
- Torres-Ruiz RA, Lohner A, Jurgens G (1996) The *GURKE* gene is required for normal

- organization of the apical region in the *Arabidopsis* embryo. *The Plant Journal* 10:1005–1016. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.10061005.x>
- Vieitez AM, Corredoira E, Martínez MT, et al (2012) Application of biotechnological tools to *Quercus* improvement. *European Journal of Forest Research* 131:519–539. <https://doi.org/10.1007/s10342-011-0526-0>
- Von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, et al (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69:233–249.
- Weston RJ (2010) Bioactive products from fruit of the feijoa (*Feijoa sellowiana*, Myrtaceae): A review. *Food Chemistry* 121:923–926. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.047>
- Yang L, Guo H, Liu Y, et al (2021) Relationship between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation and NO synthesis during osmotic stress: promoted somatic embryogenesis of *Fraxinus mandshurica*. *Journal of Forestry Research* 32:917–925. <https://doi.org/10.1007/s11676-020-01115-9>
- Youssef MA, El-Helw MR, Taghian AS, El-Aref HM (2010) Improvement of *Psidium guajava* L. using micropropagation. *Acta Horticulturae* 849:223–230. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.849.24>
- Zavattieri MA, Frederico AM, Lima M, et al (2010) Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. *Electronic Journal of Biotechnology* 13:1–9. <https://doi.org/10.2225/vol13-issue1-fulltext-4>
- Zhang G, Liu W, Gu Z, et al (2021) Roles of the wound hormone jasmonate in plant regeneration. *Journal of Experimental Botany*. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab508>
- Zhang W, Wang X min, Fan R, et al (2015) Effects of inter-culture, arabinogalactan proteins, and hydrogen peroxide on the plant regeneration of wheat immature embryos. *Journal of Integrative Agriculture* 14:11–19. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(14\)60764-4](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60764-4)
- Zhou T, Yang X, Guo K, et al (2016a) ROS homeostasis regulates somatic embryogenesis via the regulation of auxin signaling in Cotton. *Molecular and Cellular Proteomics* 15:2108–2124. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.049338>
- Zhou T, Yang X, Guo K, et al (2016b) ROS Homeostasis Regulates Somatic Embryogenesis via the Regulation of Auxin Signaling in Cotton. *Molecular & Cellular Proteomics*

15:2108–2124. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.049338>

Zhu F (2018) Chemical and biological properties of feijoa (*Acca sellowiana*). Trends in Food Science and Technology 81:121–131. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.008>