



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Morfogénese in vitro em tamarilho: análise dos processos de organogénese e embriogénese somática



Nélia Marisa Luís Mano

2013



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Morfogénese in vitro em tamarilho: análise dos processos de organogénese e embriogénese somática

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

Nélia Marisa Luís Mano

2013

Em memória da minha avó Isaura qua sempre teve muita paciência comigo.



“If you think in terms of a year, plant a seed, if in terms of ten years, plant trees, if in terms of 100 years, teach the people.” Confucius

Ilustração da capa e desenho a grafite feitos pelo meu amigo João Martins

Agradecimentos

Não podia concluir esta etapa tão importante sem antes de mais agradecer a todos os que me incentivaram, apoiaram e de alguma forma contribuíram para que a realização deste projecto fosse uma realidade. O meu muito obrigado a todos.

Começo por agradecer aos meus orientadores, que sempre guiaram o meu trabalho de forma entusiasmante, pelo tempo que me dispensaram, por toda a compreensão, pela motivação, pela confiança, pelas técnicas com que me puseram em contacto e pela revisão do texto. Ao Doutor Jorge Canhoto, pelas ideias, por toda a ajuda técnica e por todo o tempo, que entre aulas infindáveis, sempre arranjava. À Doutora Sandra Correia, pela força que me transmitiu, pelos sorrisos sempre presentes, pela disponibilidade, pela recepção das minhas ideias e pela enorme alegria e energia que trazia, mesmo prescindindo dos seus momentos pessoais e de descanso, quando reuníamos.

À D. Eulália Rosa, que sempre fez tudo para garantir as melhores condições de trabalho, pela amizade, pela preocupação, pela enorme devoção que tem por todos os membros da nossa equipa e pelo carinho. Um obrigado especial a esta pessoa que nos faz sentir tão bem no nosso local de trabalho como se estivéssemos em casa.

A todos os funcionários do departamento, pela simpatia, pela disponibilidade e pela ajuda, em especial à D. Isabel Corino e à D. Manuela Patão.

Ao Dr. José Santos Dias por todos os ensinamentos e por toda a ajuda prestada na parte da microscopia, pela preparação das amostras, pela ajuda na realização dos cortes histológicos e pela observação das amostras no microscópio electrónico de varrimento.

À Ana Carvalho, pela companhia na microscopia, pela simpatia e pela boa disposição.

Ao Doutor António Xavier Pereira Coutinho pela disponibilidade com que se apresentou para me ajudar com problemas burocráticos que surgiram e pela imensa simpatia.

À Lara Currais, à Elisa Figueiredo e à Mónica Zuzarte, que sempre se predispuseram para me ajudar na abordagem a novas técnicas, pelo tempo que despenderam a esclarecer dúvidas que iam surgindo e pela amabilidade.

Aos meus colegas de laboratório e de curso, à Inês, à Hélia, à Letice, à Patrícia, à Sofia, à Elsa, ao Pedro, ao Nelson, ao David, ao Rui, ao Cláudio, ao Loïc o meu muito obrigado por terem tornado esta jornada tão agradável, pela amizade, pela ajuda, pelo companheirismo e pelo convívio. Um agradecimento especial para a Ana e para o João que acompanharam os meus primeiros passos no laboratório e que me prestaram a sua ajuda sempre que foi necessário.

Aos meus companheiros de almoços, ao Nelson, ao João Neves, ao Rodrigo, ao João Martins, à Ana Pires, à Sara Pereira, à Sara Branco e à Daniela Novo pelos bons momentos e pelas risadas que me proporcionaram.

Aos meus amigos de sempre, à Joana, à Diana, à Sandra, à Susana, à Sílvia e ao Miguel um agradecimento especial por estarem sempre presentes, mesmo que nem sempre seja fisicamente.

À minha família, pelo apoio incondicional e pelo amor que sempre me deram. Aos meus pais e à minha irmã, pelo suporte e por estarem sempre presentes.

Ao Gonçalo, por tudo. Pelo incentivo a entrar neste mestrado, por acreditar, pela força, pela ajuda, pela amizade.

Índice

Lista de abreviaturas	ix
Resumo	x
Abstract	xii
1. Introdução	1
1.1- Contextualização do trabalho	3
1.2- Tamarilho [<i>Cyphomandra betacea</i> (Cav.) Sendt.]	4
1.2.1- Caracterização da espécie	4
1.2.2- Origem e distribuição da espécie	6
1.2.3- Importância económica da espécie.....	7
1.3- Métodos de propagação de tamarilho.....	8
1.3.1- Métodos de propagação convencionais	8
1.3.2- Processos de propagação de tamarilho <i>in vitro</i>	12
1.3.2.1- Poliferação de meristemas existentes no explante inicial	13
1.3.2.2- Indução de organogénese.....	14
1.3.2.3- Indução de embriogénese somática	14
1.3.2.3.1- Indução de embriogénese somática em tamarilho.....	16
1.4- Objectivos.....	20
2. Materiais e métodos	23
2.1. - Material Vegetal.....	25
2.2.1- Plantas de tamarilho estabelecidas <i>in vitro</i>	25
2.2.2- Tecido embriogénico.....	26
2.2- Métodos	27
2.1- Micropropagação das plantas estabelecidas <i>in vitro</i>	27
2.2- Indução de organogénese.....	28
2.3- Indução de embriogénese somática	28
2.4- Maturação de embriões somáticos.....	30
2.5- Maturação de embriões somáticos a partir de culturas de tecido embriogénico obtido em suspensões celulares.....	31
2.6- Germinação dos embriões somáticos	32
2.7- Análises morfológicas e histológicas	33
2.8- Medição dos níveis de peróxido de hidrogénio endógeno das linhas embriogénicas	34

3.	Resultados	35
3.1-	Indução de organogénese	37
3.2-	Indução de embriogénese somática	38
3.3-	Maturação dos embriões somáticos	41
3.3.1-	Agentes osmóticos	43
3.3.2-	Carvão activado	45
3.3.3-	Ácido abscísico	45
3.3.4-	Agentes oxidativos	46
3.4-	Maturação de embriões somáticos a partir de culturas de tecido embriogénico obtido em suspensões celulares.....	47
3.5-	Germinação dos embriões somáticos formados.....	49
3.6-	Análises morfológicas e histológicas	49
3.7-	Níveis endógenos de peróxido de hidrogénio	56
4.	Discussão	57
4.1-	Indução de organogénese	59
4.2-	Indução de embriogénese somática	60
4.3-	Maturação dos embriões somáticos	62
4.3.1-	Agentes osmóticos	63
4.3.2-	Carvão activado	65
4.3.3-	Ácido abscísico	66
4.3.4-	Agentes oxidativos	67
4.4-	Maturação dos embriões somáticos a partir de culturas de tecido embriogénico obtidos em suspensões celulares.....	68
4.5-	Germinação dos embriões somáticos formados.....	69
4.6-	Análises morfológicas e histológicas	70
4.7-	Níveis de peróxido de hidrogénio endógeno	71
5.	Conclusões e perspectivas Futuras	73
6.	Bibliografia	77

Lista de abreviaturas

2,4-D- Ácido 2,4 diclorofenoxiacético

μ- micro

ABA- Ácido abscísico

BA- Benziladenina

g- grama

h- hora

l- litro

LEA- Late embryogenesis abundant protein

M-Molar

min- minuto

MS- Meio base Murashige e Skoog (1962)

N- normal

NAA- Ácido 1-naftaleno acético

nm- nanómetro

°C- Grau Celsius

PEG- Polietilenoglicol

Rpm- rotações por minuto

Resumo

A embriogénese somática é um processo que permite a rápida propagação de espécies economicamente importantes e uma poderosa ferramenta na transformação genética. Uma das fases mais importantes neste processo é a maturação dos embriões somáticos, visto que durante esta fase é comum ocorrer um número significativo de embriões anómalos, o que pode ter implicações na sua conversão em plântulas. A indução da embriogénese somática e o desenvolvimento de embriões de tamarilho (*Cyphomandra betacea*) foram estudados no Laboratório de Biotecnologia da FCTUC e usados com sucesso na regeneração das plantas a partir de vários tipos de explantes. É um sistema de duas fases no qual a embriogénese somática é induzida em meio MS, na presença de uma auxina e com concentrações elevadas de sacarose, seguindo-se a transferência do tecido embriogénico obtido para um meio sem auxina e com níveis reduzidos de sacarose, de modo a obter embriões somáticos. Trabalhos anteriores demonstraram que otimizando as condições de maturação há um maior rendimento e uma melhor qualidade dos embriões formados. Neste trabalho, pretendeu-se otimizar a maturação de embriões somáticos de tamarilho, testando diferentes tipos de calos embriogénicos em diversas condições de maturação. Calos com diferentes idades, origens e qualidades embriogénicas foram avaliadas, variando a composição do meio de cultura, em particular pela adição de carvão activado, várias concentrações de sacarose e de outros agentes osmóticos para além da sacarose. A manifestação de diferentes capacidades embriogénicas por parte das linhas estudadas perante os tratamentos aplicados, confirmou assim a importância da origem e da idade dos explantes na obtenção de embriões somáticos maduros. O calo induzido a partir de material micropropagado de uma árvore adulta (TJ-CE3) revelou uma ausência de competência embriogénica, que poderá ser justificada pelos baixos níveis endógenos de peróxido de hidrogénio nesta linha de calo (cerca de 6 $\mu\text{mol/l}$), quando comparados aos detectados em calos embriogénicos (cerca de 12 $\mu\text{mol/l}$) induzidos na mesma altura, mas a partir de material com origem seminal (linha TV-CE2). De um modo geral, foi a linha TV-CE1 a que demonstrou uma resposta melhor, em termos do número de embriões formados, sendo o ABA (2 mg/l, TMA2) o composto mais eficaz, neste tipo de calo, promovendo o desenvolvimento de 204 embriões/100 mg de calo. No caso do TV-CE2, uma linha de calo mais recentemente estabelecida, contrariamente ao esperado, este apresentou respostas inferiores ao TV-CE1, sendo os melhores resultados obtidos para o meio TM2 (50,3

embriões somáticos/100 mg de calo). O controlo da maturação e dos processos de conversão através da análise histológica permitiram observar os efeitos das condições de cultura no desenvolvimento dos embriões, em particular no padrão apical-basal e na organização de meristema apical. Observou-se que, mesmo em embriões anómalos o meristema apical se organizou de acordo com o padrão normal, sugerindo que este tipo de embriões, teria potencial para desenvolver de uma forma normal e atingir a conversão em plântulas.

Para além dos ensaios de maturação realizados foram testados factores influentes na indução de embriogénese somática como o genótipo, a dimensão do explante e as condições do meio, mais concretamente a sua composição química. Nestes ensaios observaram-se disparidades nas taxas de indução observadas para os 3 genótipos testados e na quantidade de calo observado. Foi o genótipo de tamarilho vermelho que apresentou as taxas de indução mais altas, a rondar os 68% de explantes com tecido embriogénico. A fragmentação dos explantes foliares em secções com 3-10 mm revelou-se uma técnica eficaz, permitindo a formação de quantidades superiores de calo embriogénico.

Os ensaios de indução de organogénese *in vitro* realizados, recorrendo a material vegetal estabelecido *in vitro* (linha TJ), proveniente de uma árvore adulta, demonstraram, à semelhança do que se observou na maturação de embriões somáticos, uma baixa capacidade organogénica desta linha, visto que das gemas isoladas apenas 13,3% geraram rebentos caulinares.

Palavras-chave: calo embriogénico, maturação, organogénese, peróxido de hidrogénio, stress

Abstract

Somatic embryogenesis is a process that allows the fast propagation of economical important species and a powerful tool in breeding and genetic transformation. One of the most critical phases in this process is the embryo maturation, because during this stage it is usual to find a significative number of anomalous embryos, what may have implications in their conversion in emblings. Somatic embryogenesis induction and somatic embryo development of the Solanaceous tamarillo tree (*Cyphomandra betacea*) have been studied at the Biotechnology Laboratory of FCTUC, and successfully used on the regeneration of these plants from several types of explants. It is a two-step system in which somatic embryogenesis is induced in MS medium containing an auxin and high sucrose concentrations, and the embryogenic tissues obtained must be transferred to an auxin-free medium, with reduced sucrose levels, in order to obtain somatic embryos. Previous work has demonstrated that, by optimizing maturation conditions, a higher yield and a better quality of the formed embryos can be achieved. In this work, it was intended to optimize the maturation of somatic embryos of tamarillo by testing different types of embryogenic callus in different maturation conditions. Callus at different ages, embryogenic origin and quality were assessed by varying the composition of culture medium, in particular by addition of activated charcoal, various concentrations of sucrose and other osmotic agents other than sucrose. The expression of different capacities by the embryogenic lines studied before the treatments applied, thus confirming the importance of the origin and age of the explants to obtain mature somatic embryos. The callus induced from micropropagated material of a mature tree (TJ-CE3) revealed an absence of embryogenic competence, which can be explained by the endogenous low levels of hydrogen peroxide in this callus line (about 6 $\mu\text{mol} / \text{l}$), where compared to those detected in embryogenic callus (about 12 $\mu\text{mol} / \text{l}$) induced at the same time but from seminal material source (line TV-CE2).

In general, it was line TV-CE1 that showed a better response in terms of the number of embryos formed being ABA (2 mg / l, TMA2) the most effective compound in this type of callus, promoting the development of 204 embryos/ 100 mg callus. In the case of line TV-CE2, a callus more recently established, contrary to expectations, it showed lower responses to TV-CE1, the best results being obtained for the middle TM2 (50.3 somatic embryos /100 mg callus). Control of the maturation and conversion processes by histological analysis allowed observe the effects of culture conditions on embryo

development, in particular in the apical-basal pattern and in the apical meristem organization. It was observed that, even in the abnormal embryos apical meristem is organized according to normal, suggesting that this type of embryos would have the potential to develop normally and achieve conversion to plantlets.

In addition to the maturation tests performed were evaluated factors that influence the induction of somatic embryogenesis as the genotype, the size of the explant and the environment conditions, more specifically to their chemical composition. In these tests it was observed differences in the rate of induction observed for the 3 genotypes and the amount of callus observed. Red tamarilho genotype showed higher induction rates, hovering around 68% of explants with embryogenic tissue. Fragmentation of leaf explants into sections of 3-10 mm proved to be an effective technique, allowing the formation of higher amounts of embryogenic callus.

The induction of organogenesis assays performed *in vitro*, using established plant material *in vitro* (TJ line) from a mature tree, shown, similar to that observed in the maturation of somatic embryos, low organogenic capacity of this line, since that of gems isolated only 13.3% generated stem shoots.

Keywords: embriogenic calli, hydrogen peroxide, maturation, organogenesis, stress

1. Introdução



1.1- Contextualização do trabalho

A agricultura foi desde sempre considerada uma actividade que sustenta a Humanidade, garantindo comida, roupa/aquecimento e trabalho para a maioria da população ativa (Federico, 2005). Tudo indica que esta actividade teve origem no sudoeste asiático, numa região designada por Crescente Fértil, há cerca de 10 000 anos atrás (Brown *et al.*, 2008).

Desde a segunda guerra mundial a população mundial aumentou de 2000 milhões para cerca de 7000 milhões de habitantes (Avni e Blázquez, 2011) e, segundo dados da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) relativos a 2010-2012, cerca de 868 milhões de pessoas estão subnutridas (<http://www.fao.org>, acessido a 22/04/2013). Tendo em conta a previsão de um aumento da população até aos 10000 milhões de habitantes em 2050 (Canhoto, 2010), para que as necessidades alimentares globais sejam satisfeitas, tanto as tecnologias convencionais como a biotecnologia serão necessárias (Borlaug e Dowswell, 2005).

O melhoramento genético convencional teve um grande impacto no século 20, num movimento designado Revolução Verde que permitiu a criação de novas variedades, mais produtivas e com maior rendimento (Borlaug, 2000). Os métodos associados ao aumento da produtividade de culturas têm tido bastante sucesso, contudo a garantia de alimento não se prende só com a quantidade de comida disponível mas também com o seu valor nutricional (Avni e Blázquez, 2011).

No Laboratório de Biotecnologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra (FCTUC) têm sido realizados vários trabalhos na área da biotecnologia vegetal, com particular destaque para a embriogénese somática. Esta técnica tem-se revelado uma poderosa ferramenta para o melhoramento vegetal, via técnicas de transformação genética, de propagação em massa de material seleccionado e de criopreservação de germoplasma. O tamarilho é uma espécie de eleição na busca pela compreensão dos mecanismos básicos que regem a embriogénese somática e é neste sentido que este trabalho foi desenvolvido, com foco especial para uma das fases mais críticas da técnica, a maturação de embriões somáticos.

1.2- Tamarilho [*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.]

1.2.1- Caracterização da espécie

O tamarilho, *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt (sin. *Solanum betaceum*), igualmente conhecido por “tree tomato” é também conhecido como berenjena (México e Perú), granadilla (Guatemala), lima tomate (Bolívia), Pepino de árbol / tomate de agua (Colômbia), tomate chimango / tomateiro da serra (Brasil), tomate cimarrón (Costa Rica), tomate de Castilla (Venezuela), tomate de La Paz (Perú e Chile) ou tomate del monte (Argentina e Bolívia) (Bohs, 1989). É uma planta da família Solanaceae, uma das famílias economicamente mais importantes e que inclui o tomateiro, a batateira, os pimenteiros, a beringela e o tabaco (Heiser e Anderson, 1999) para citar apenas as mais conhecidas. Esta espécie foi inicialmente descrita em 1801 por Cavanilles com o nome *Solanum betaceum* e, em 1845, foi transferida para o género *Cyphomandra* por Sendtner (Guimarães *et al.*, 1996). A designação vulgar “tamarilho” surgiu em 1967, na Nova Zelândia, como consequência de uma rápida produção e consumo do fruto, que requeria um nome apelativo do ponto de vista comercial e que não fosse confundido com o já muito conhecido tomate (*Solanum lycopersicum*), visto que até então o tamarilho era conhecido como tree tomato (Atkinson e Gardner, 1993). A nível citológico, o número de cromossomas no tamarilho foi estabelecido por Vignoli em 1945 como $2n = 24$ (Guimarães *et al.*, 1988).

Trata-se de uma espécie que cresce principalmente em altitudes entre os 1500 e os 3000 metros (Bohs, 1989; Cohen *et al.*, 2000). Em climas mais frios adapta-se melhor a altitudes mais baixas e a temperaturas que não desçam abaixo dos 10°C (Correia e Canhoto, 2012). À semelhança das restantes espécies do género *Cyphomandra*, o tamarilho é um arbusto ou árvore de pequeno porte como se pode observar na figura 1a, normalmente com 2 a 4 m de altura (Lopes *et al.*, 2000), podendo ocasionalmente atingir 7 ou 8 m. Quando o hábito é arbóreo é normalmente composta por um único tronco com uma copa alargada (Fig. 1a) onde surgem as flores e, mais tarde, os frutos (Bohs, 1989). As flores, representadas na figura 1b são rosadas/esbranquiçadas, perfumadas (Lopes *et al.*, 2000) e normalmente desenvolvem-se a partir de meristemas axilares (Correia e Canhoto, 2012), desde meados da Primavera a meados do Verão (Prohens *et al.*, 1996; Correia *et al.*, 2009; Correia *et al.*, 2012). A polinização é principalmente autogâmica, o que resulta na baixa variabilidade encontrada em populações naturais (Lopes *et al.*, 2000). As suas folhas

1. Introdução

perenes, com 10 a 30 cm de comprimento e de cor verde, são largas (Correia e Canhoto, 2012) e suculentas, frequentemente com base cordiforme, podendo ser simples, lobuladas ou pinuladas compostas (Bohs, 1989, Fig. 1c).

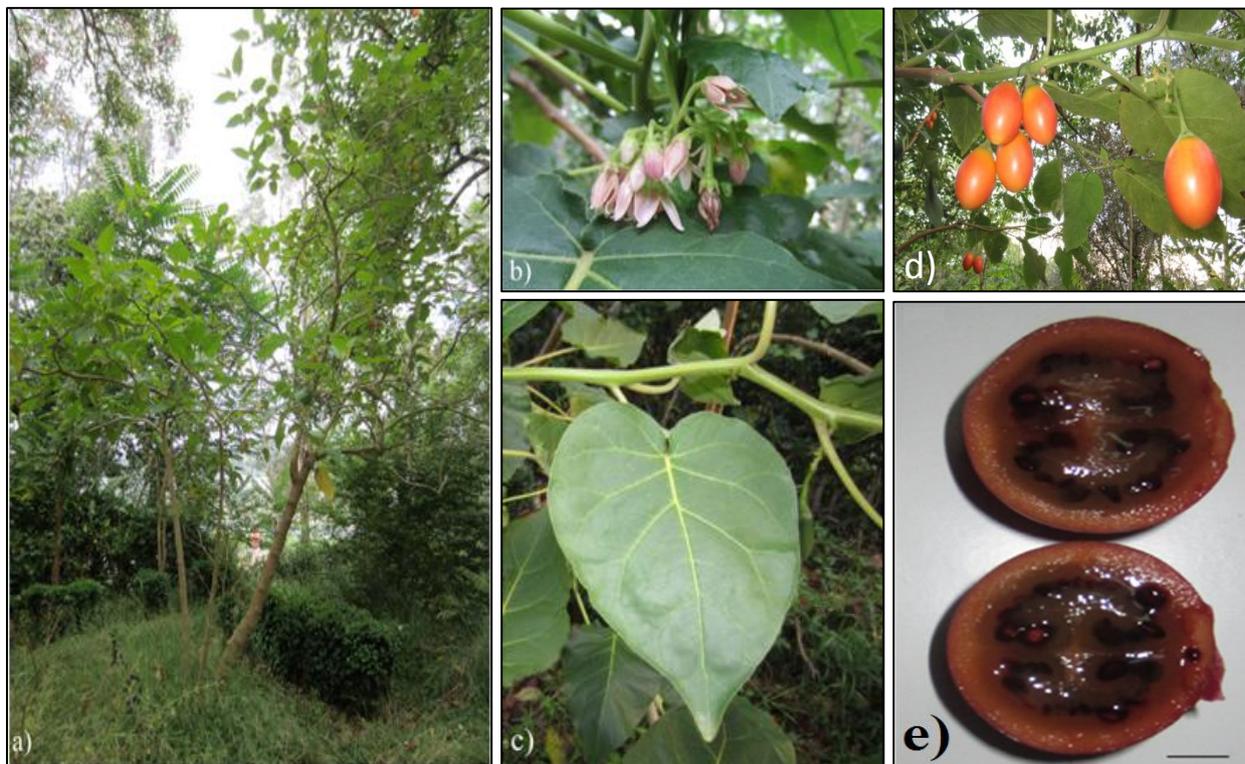


Figura 1 - Tamarilho (*Cyphomandra betacea*). **a)** Árvore adulta de tamarilho, com 15 anos, localizada no Jardim Botânico da Universidade de Coimbra. **b)** Pormenor da flor, rosa/esbranquiçada. **c)** Folha de tamarilho, com a base cordiforme. **d)** Frutos maduros na árvore, onde se nota o seu desenvolvimento em grupos. **e)** Detalhe do fruto, onde se podem ver as sementes. A barra corresponde a 1 cm.

Os frutos apresentam um longo pedúnculo, podem ter entre 5-10 cm de comprimento e 3-5 cm de largura (Fig. 1d) e possuem muitas sementes (Fig. 1e). São caracterizados pela sua forma oval pontiaguda em ambas as extremidades, como é possível comprovar através da representação, surgindo isolados ou em conjuntos de 3-12 unidades, entre Outubro a Abril (Correia e Canhoto, 2012). O epicarpo pode ter tonalidades vermelhas, amarelas, cor de laranja ou uma mistura das três, consoante o cultivar (Meadows, 2002). A sua polpa tem uma coloração que varia entre o vermelho alaranjado e o amarelado (Correia e Canhoto, 2012), é consistente e suculenta, um pouco ácida (pH varia entre 3,7 e 3,8) e apresenta um sabor agradável (Guimarães *et al.*, 1996). As sementes são achatadas, maiores e mais duras que as do tomate e de cor amarelo-laranja (Correia e Canhoto, 2012). Plantas derivadas de semente iniciam a produção de fruto após mais ou

1. Introdução

menos 18 meses e podem produzir 15-20 kg/ano (Correia e Canhoto, 2012), rendendo comercialmente 15-17 toneladas/ha (Bohs, 1989), durante 6 a 10 anos (Correia e Canhoto, 2012). Os cultivares podem variar muito, no tamanho, na forma e na cor dos seus frutos, sendo os cultivares com frutos vermelhos os mais apreciados devido ao seu sabor, à apelativa natureza do seu epicarpo vermelha e à possibilidade de utilizar a sua polpa como uma guarnição colorida (Eagles *et al.*, 1994; Lopes *et al.*, 2000).

1.2.2- Origem e distribuição da espécie

O tamarilho, encontrado em climas subtropicais, é originário dos Andes, em particular do sul da Bolívia e norte da Argentina (Meadows, 2002), de onde se espalhou para outras zonas tropicais e subtropicais da América do Sul e da América Central, incluindo o Brasil, as Antilhas e o México. Mais tarde, foi trazido para a Europa e, no século XIX, as suas sementes foram enviadas para a China e para as colónias Britânicas: Índia, Sri Lanka, Hong Kong, Austrália, Nova Zelândia e África do Sul (Guimarães *et al.*, 1996), como se pode observar na figura 2.

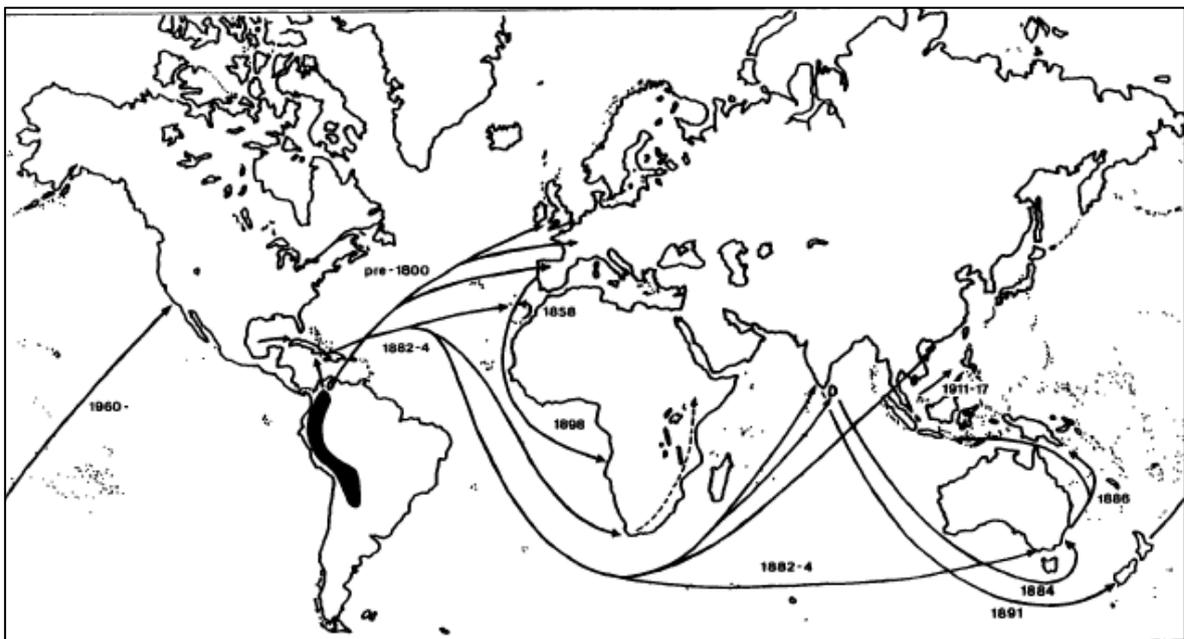


Figura 2- Ilustração representativa da dispersão do tamarilho a partir da zona Andina para o resto do Mundo. Na imagem é possível ter-se uma referência cronológica da introdução da espécie em vários países distintos, mais em particular a data de introdução em Portugal (cerca de 1800, no Porto) e da sua introdução no país que é actualmente o maior produtor de tamarilho, a Nova Zelândia, em 1891. Figura adaptada de Bohs, 1989.

1. Introdução

Sendo actualmente cultivado em várias partes do Mundo, mais concretamente nos USA, no Brasil, na Índia, no Sri Lanka, na Nova Zelândia, no Quênia e em algumas zonas do Sul da Europa (Guimarães *et al.*, 1996), a sua cultura é bastante promissora noutras regiões do mundo, nomeadamente em países mediterrânicos tais como a Espanha e a Itália (Acosta-Quezada *et al.*, 2010) e Portugal.

1.2.3- Importância económica da espécie

O tamarilho é cultivado fundamentalmente devido aos seus frutos comestíveis que têm uma composição nutricional rica e variada, com valores elevados de proteínas (1,5-2 g/100 g), vitamina C (30-45 mg/100 g), vitamina E (1,86 mg/100 g), provitamina A e alguns minerais como ferro e potássio. Adicionalmente, o seu conteúdo em hidratos de carbono (4,7 g/100 g), bem como o seu valor calórico (cerca de 28 kcal/100 g) são reduzidos (McCane e Widdowson, 1992). Também têm sido realizados estudos relativos ao conteúdo e ao tipo de antocianinas e carotenóides no tamarilho e os resultados revelaram uma importância biológica, terapêutica e propriedades antioxidantes de alguns destes compostos (Correia e Canhoto, 2012).

Quando maduro, o fruto tem as mesmas aplicações que o tomate comum (Guimarães *et al.*, 1996), podendo ser comido cru, usado em saladas ou cozinhado. É utilizado em sobremesas, aperitivos, sumos, gelados, iogurtes, polpas, molhos, comida de bebé e geleias/compotas (Pantoja *et al.*, 2009). Na Bolívia, estes frutos são misturados com malaguetas para a confecção de um molho que é usado como condimento. Na Papua-Nova Guiné o tamarilho é fervido e usado em sopas. Na América do Sul é misturado com leite e açúcar de forma a fazer uma bebida refrescante muito semelhante ao *milkshake* norte-americano (Bohs, 1989). Em algumas zonas do globo a planta é usada na medicina popular. Por exemplo, na Jamaica e na Bolívia, utiliza-se contra infecções do fígado, já na Colômbia e no Equador é aplicada no tratamento de inflamações das amígdalas ou anginas, bem como para combater a gripe (Quiroga, 2008). Também se considera um fruto com potencialidades no estímulo da actividade cerebral, na cura de enxaquecas e dores de cabeça, obesidade, hipertensão e rinites (Gatita e Almeida., 2003).

Em países como a Nova Zelândia e a Colômbia, o tamarilho tem um elevado valor comercial, sendo fonte de receitas derivadas da sua exportação. A Nova Zelândia, actualmente o maior produtor a nível mundial, produz mais de 2000 toneladas de tamarilho

1. Introdução

por ano, sendo 80% vendidos frescos em mercados locais e os frutos de melhor qualidade vendidos aos mercados internacionais, principalmente europeus e norte-americanos (Eagles *et al.*, 1994). Por esse motivo, neste país, foram estabelecidos programas de melhoramento de tamarilho, através da selecção de plântulas e de gestão de pomares de forma a produzir frutos de melhor qualidade (Atkinson e Gardner, 1993).

No nosso país esta espécie é cultivada essencialmente como ornamental, tendo no entanto sido feitos esforços para a explorar comercialmente, sobretudo nas ilhas atlânticas, devido aos preços apelativos que os frutos podem atingir e que incentivam, assim, cada vez mais os produtores do continente que se vão apercebendo gradualmente do grande potencial comercial que o tamarilho tem (Lopes *et al.*, 2000). No entanto o seu cultivo apresenta algumas limitações particularmente face a geadas (mesmo em períodos pequenos origina a senescência da folhagem e dos ramos mais pequenos), a temperaturas constantemente elevadas, a seca prolongada, a solos inundados ou a águas estagnadas (Guimarães *et al.*, 1996).

Apesar desta espécie estar inserida no que, por convenção, se designa de NUC's (Neglected or Underutilized Crops), isto é, uma espécie que tem potencial para ser utilizada na agricultura mas que, por várias razões, não tem sido devidamente explorada (Acosta-Quezada *et al.*, 2010; Canhoto, 2010), os preços do fruto de tamarilho no mercado rondam os 10-15€/kg. Assim torna-se importante melhorar esta espécie fruteira, quer do ponto de vista qualitativo quer no que diz respeito à sua produção. De referir ainda que o tamarilho reúne condições para ser uma espécie competitiva em algumas zonas do nosso país, podendo vir a tornar-se uma espécie interessante para os nossos agricultores.

1.3- Métodos de propagação de tamarilho

1.3.1- Métodos de propagação convencionais

Em condições naturais a multiplicação de tamarilho é feita essencialmente por reprodução sexuada através da formação de sementes. No entanto, muitas espécies de plantas recorrem a métodos de multiplicação vegetativa como estratégias reprodutivas (Canhoto, 2010). A formação da semente está estreitamente relacionada com vários

1. Introdução

processos fisiológicos que vão desde a fecundação e formação do zigoto passando pelo desenvolvimento da semente e dispersão dos frutos (Fowler e Sturion, 2000), sendo o processo de desenvolvimento do embrião designado de embriogênese zigótica (Fehér, 2003, Fig. 3).

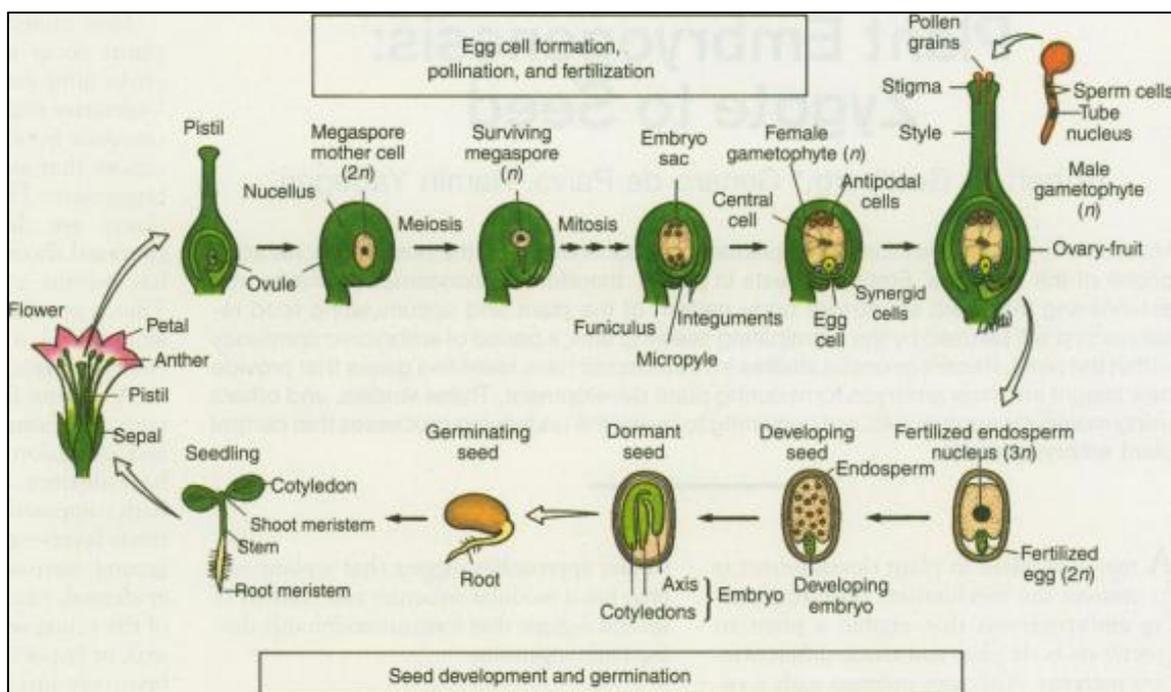


Figura 3- Esquema síntese do processo fertilização e formação da semente. A germinação do grão de pólen, a formação do tubo polínico e a sua entrada no saco embrionário através do micrópilo vão permitir a dupla fecundação e assim, a formação do zigoto que após uma série de divisões vai culminar num embrião e que após a acumulação de substâncias de reserva está pronto a germinar. Adaptado de Goldberg *et al.* (1994).

No tamarilho, à semelhança do que acontece com todas as angiospérmicas, a embriogênese segue 3 fases principais. Uma primeira fase de morfogênese em que o eixo polar é definido, com a especificação do ápice caulinar e radicular assim como dos tecidos embrionários e do sistema de órgãos (West e Harada, 1993). A segunda fase, caracterizada pela acumulação de substâncias de reserva, é a maturação (Dodeman *et al.*, 1997). Na última fase o embrião prepara-se para a dessecação, sofre desidratação e, em muitas espécies, entra num período de suspensão do desenvolvimento vulgarmente conhecido como dormência (West e Harada, 1993). As fases pelas quais o embrião passa durante o seu desenvolvimento encontram-se bem caracterizadas num grande número de espécies e

1. Introdução

são, no caso das dicotiledóneas, a fase globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (von Arnold *et al.*, 2002).

Após 3 divisões sucessivas, o zigoto dá origem a um embrião no estado octante (Capron *et al.*, 2009). Segue-se a diferenciação da protoderme e a formação de um embrião globular (Rao, 1996). No estado cordiforme o embrião já é constituído por cerca de 200 células e os primórdios dos órgãos da plântula (cotilédones, hipocótilo e meristemas primários) são anatomicamente distinguíveis, bem como os diferentes tipos de tecidos primários - procâmbio, meristema fundamental e protoderme (Capron *et al.*, 2009). É nesta fase que o embrião passa a ser formado três domínios espaciais distintos: o domínio apical composto pelos cotilédones, pelo ápice caulinar e pela zona superior do hipocótilo, o domínio central composto maioritariamente pelo hipocótilo e o domínio basal constituído pelo ápice radicular (von Arnold *et al.*, 2002).

Na fase torpedo, ocorre uma elevada expansão celular resultando no alongamento do embrião ao longo do eixo hipocótilo-raiz (Rao, 1996).

No estado cotiledonar, as células começam a acumular substâncias de reserva e os cotilédones aumentam de tamanho. O embrião completou a sua morfogénese e vai sofrer um processo de desidratação, acompanhado pela produção de compostos, como as proteínas LEA (“Late Embryogenesis Abundant”), que vão conferir protecção à dessecação. Após esta fase o embrião pode ou entrar num estado de dormência ou germinar e desenvolver-se, segundo a actividade dos meristemas apicais do caule e da raiz (Goldberg *et al.*, 1994; Rao, 1996; Dodeman *et al.*, 1997; Canhoto, 2010). Em paralelo com o desenvolvimento do embrião e a formação da semente ocorrem processos como o desenvolvimento do fruto e a modificação do endosperma (Gustafson, 1939). As várias fases de desenvolvimento indicadas anteriormente estão esquematizadas na figura 4.

1. Introdução

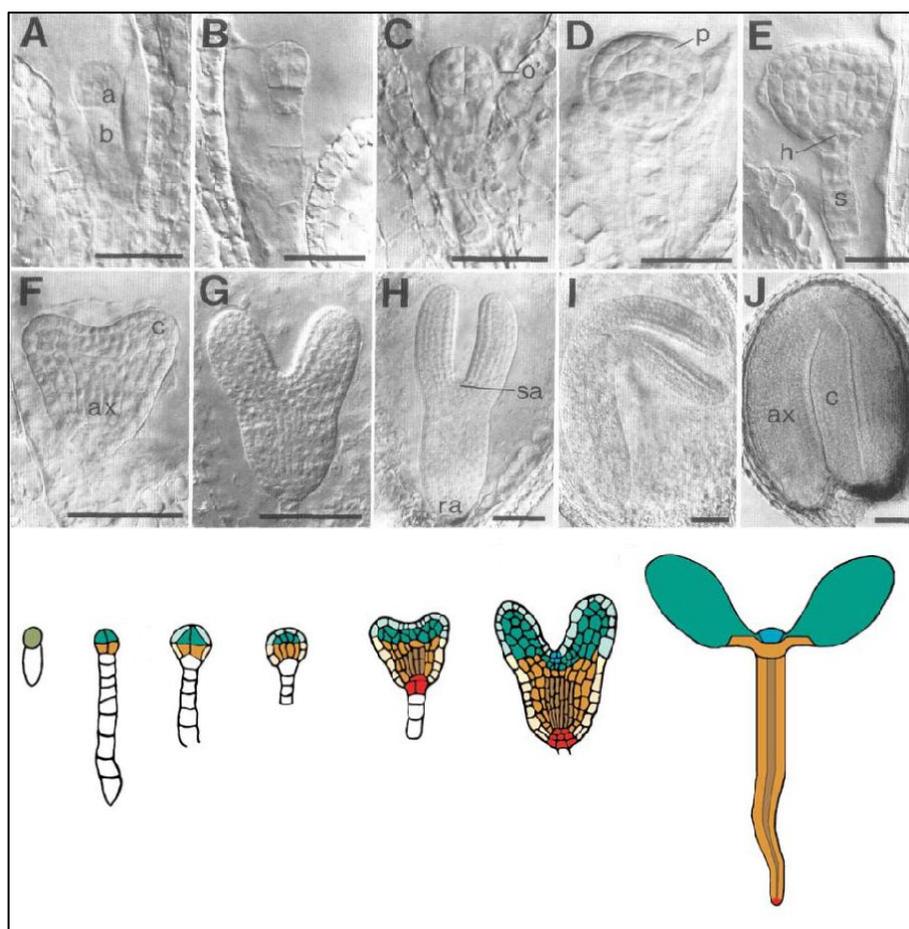


Figura 4- Representação esquemática das várias fases de desenvolvimento do embrião zigótico. A parte de cima da imagem mostra as várias etapas recorrendo a técnicas de microscopia, enquanto a parte de baixo esquematiza e dá destaque à formação das várias camadas de tecidos e de órgãos. Parte de cima adaptada de West e Harada, 1993 e parte de baixo adaptada de Capron *et al.* (2009).

Embora a propagação de tamarilho por via seminal seja o método mais fácil de propagar tamarilho e origine árvores com fenótipos interessantes, com esta técnica há a desvantagem de não se conseguir controlar as características genéticas das culturas e as baixas taxas de germinação das sementes (Correia *et al.*, 2009; Aslam *et al.*, 2011; Correia e Canhoto, 2012).

A propagação vegetativa pode ser definida como o método através do qual as plantas se reproduzem sem recorrer à mistura de genes, com base na totipotência vegetal (Canhoto, 2010). No tamarilho, os principais métodos de propagação vegetativa são a estacaria e a enxertia (Lopes *et al.*, 2000). A propagação por estacaria origina plantas de menores dimensões quando comparadas à via seminal, com ramos pendentes (Correia e

1. Introdução

Canhoto, 2012) e garante uniformidade, no entanto, as taxas de multiplicação são muito baixas e pode levar à transmissão de doenças através do material vegetal (Gahakwa *et al.*, 2013). A propagação por enxertos em tamarilho foi utilizada recorrendo a *Solanum mauritianum*, na Nova Zelândia e na Austrália (Slack, 1976), com o objectivo de melhorar a tolerância a solos inundados, reduzindo a susceptibilidade das suas raízes à podridão (Guimarães *et al.*, 1996).

Embora as duas últimas técnicas referidas permitam propagar os genótipos desejados (Minocha e Minocha, 1995) estes métodos apresentam também algumas limitações: podem ser um veículo de condução de doenças (García e Martínez, 1995), como o vírus do mosaico do tamarilho (TaMV) que é transferido se o método de multiplicação escolhido for propagação vegetativa (Gahakwa *et al.*, 2013), o enraizamento pode ser difícil, pode haver rejeição à enxertia, nalguns casos a propagação vegetativa tem que ser feita em fases juvenis e são métodos morosos, em que se produz um número reduzido de plantas e em que existe alguma dificuldade em obter os meios necessários para a sua concretização (Canhoto, 2010).

1.3.2- Processos de propagação de tamarilho *in vitro*

A micropropagação pode ser definida como a clonagem através de técnicas de cultura de tecidos (Geneve, 2001), recorrendo a material de pequenas dimensões (Canhoto, 2010) e é recorrentemente utilizada há mais de 50 anos (Gahakwa *et al.*, 2013).

Para ultrapassar os problemas normalmente associados às técnicas de propagação e para manter o germoplasma, a propagação *in vitro* apresenta-se como dos métodos com maior sucesso e que providencia uma produção de plantas rápida, geneticamente uniforme e livre de doenças (Aslam *et al.*, 2011). As culturas estabelecidas apresentam maior vigor, rendimentos mais elevados (Gahakwa *et al.*, 2013) e uma qualidade fitossanitária superior, face à propagação convencional (Canhoto, 2010). A aplicação desta técnica em tamarilho e em árvores elite de outras plantas lenhosas permite a obtenção de clones mais produtivos, apresenta novas alternativas e por vezes, soluções únicas em programas de melhoramento (Golle *et al.*, 2009). O meio, solidificado, é fácil de manusear no sentido de produzir elevados níveis de resposta, as taxas de regeneração de plantas são elevadas e as plantas formadas são férteis (Gaj, 2001). O sucesso desta técnica, a uma escala comercial,

1. Introdução

depende, em última análise, da capacidade de transferir as plantas formadas em larga escala, a preços baixos e com taxas elevadas de sobrevivência (Hazarika, 2006).

As metodologias de micropropagação são divididas em três tipos diferentes, de acordo com o material inicial e com a resposta obtida: proliferação de meristemas existentes no explante inicial, indução de organogênese e embriogênese somática (Canhoto, 2010).

1.3.2.1- Proliferação de meristemas existentes no explante inicial

Assim que se começou a perceber melhor o funcionamento dos meristemas (Fig. 5) e as suas aplicações, segmentos caulinares nodais com meristemas axilares dormentes, começaram a ser cultivados, estimulando o seu desenvolvimento. Uma vez que os meristemas já estavam presentes na planta mãe, estas estruturas começaram a ser usadas para a multiplicação clonal (Kumar *et al.*, 2006). Para além da multiplicação em larga escala, a propagação de meristemas pode ser usada com outras finalidades como estudos fundamentais do funcionamento do meristema, a conservação de germoplasma, a obtenção de plantas livres de vírus a partir de material vegetal contaminado e microenxertia, ou seja, enxertia executada *in vitro* (Canhoto, 2010).

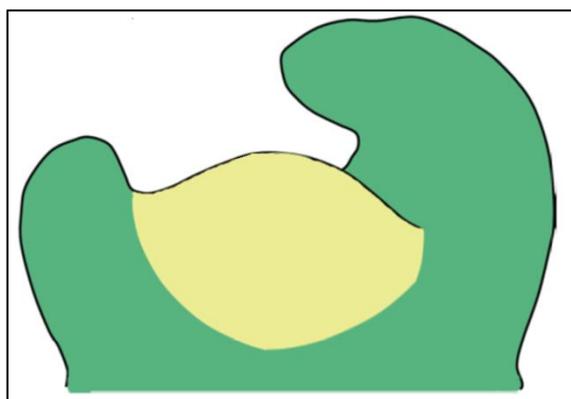


Figura 5- Esquemática do meristema apical caulinar, representado a amarelo e dos primórdios foliares. Adaptado de Rodrigues e Kerbauy (2009).

1. Introdução

1.3.2.2- Indução de organogénese

A organogénese *in vitro* é um processo onde os órgãos (meristemas, raízes, caules) são obtidos *de novo*, sob certas condições físicas e químicas (Thorpe, 1980). Esta técnica pode ser conseguida recorrendo a diferentes tipos de explantes tais como embriões, meristemas apicais, órgãos primordiais, camadas celulares de órgãos maduros, fragmentos complexos de órgãos maduros, órgãos intactos e protoplastos (Hicks, 1980). Em tamarilho, já se conseguiu a regeneração de plantas completas recorrendo a organogénese de diferentes tipos de explantes, entre eles hipocótilos, cotilédones, raízes e embriões zigóticos maduros e também de protoplastos (Guimarães *et al.*, 1996; Santos, 2012).

A organogénese *in vitro* depende da aplicação de hormonas exógenas, particularmente de auxinas e citocininas (Angulo-Bejarano e Paredes-López, 2011), da capacidade do tecido para responder (Sugiyama, 1999) bem como da temperatura de incubação ou do tipo e intensidade da radiação (Turk *et al.*, 1994).

Existem dois processos distintos que podem levar à formação de plantas por organogénese. Um deles é directamente, e neste há o desenvolvimento de meristemas adventícios que se desenvolvem em rebentos caulinares e que após enraizamento formam novas plantas. O outro processo, mais vulgar, é indirecto e difere do primeiro essencialmente na formação de um calo, a partir do qual se forma gemas, seguindo-se depois o enraizamento (Bansal e Pandey, 1993; Hicks, 1994; Tonon *et al.*, 2001; Canhoto, 2010).

Esta técnica apresenta um elevado potencial para propagação em larga escala, visto que podem ser formados centenas de rebentos a partir de um único explante. Teoricamente o limite de rebentos formados é o número de células no explante mas na verdade nem todas as células são induzidas (Canhoto, 2010). Uma desvantagem do processo de organogénese prende-se com os altos custos do processo para uma escala comercial (Montalbán *et al.*, 2010).

1.3.2.3- Indução de embriogénese somática

A embriogénese somática é o processo pelo qual células somáticas, sob determinadas condições, sofrem uma reestruturação (desdiferenciação) e uma reprogramação (ou rediferenciação), formando células embriogénicas com capacidade de

1. Introdução

gerar embriões e, em última instância, originar novas plantas, tudo sem ocorrer à fusão dos gametas (Jiménez, 2001; Rose *et al.*, 2010; Yang e Zhang, 2010). Esta habilidade de formar embriões morfológicamente normais e regenerar plantas completas a partir de células somáticas indiferenciada é exclusiva das plantas (Zimmerman, 1993).

Sendo um processo análogo à embriogénese zigótica em que uma ou várias células são precursoras de embriões (Santa-Catarina *et al.*, 2001; Yang e Zhang, 2010), a embriogénese somática tem sido utilizada como um modelo atractivo para o estudo da embriogénese, especialmente em fases iniciais do desenvolvimento, tendo em conta as dificuldades em aceder às fases iniciais do desenvolvimento embrionário no interior do óvulo (von Recklinghausen *et al.*, 2000; Karami e Saidi, 2010).

O processo de embriogénese somática depende da espécie e da selecção dos génotipos que melhor respondem (Pullman *et al.*, 2003), sendo investigados alguns efeitos na manipulação de culturas tais como os reguladores de crescimento das plantas e factores nutricionais, físicos e químicos (Komatsuda *et al.*, 1992).

A embriogénese somática é o método preferencial para propagação em massa de plantas geneticamente uniformes (Stasolla e Yeung, 2003), muito efectivo na propagação de plantas elite (Montalbán *et al.*, 2010) sendo mesmo considerado por muitos como o método menos dispendioso para estes fins (Stasolla e Yeung, 2003), pois possibilita a produção de um número ilimitado de embriões somáticos (Montalbán *et al.*, 2010; Aslam *et al.*, 2011). Outra aplicação da embriogénese somática é na possibilidade de criopreservar material embriogénico que pode ser conservado até que ensaios de campo permitam aferir a qualidade do material propagado (Minocha e Minocha, 1995; Troch *et al.*, 2009). A embriogénese somática apresenta-se também como um sistema ideal em protocolos de transformação genética, assumindo a origem unicelular dos embriões (Montalbán *et al.*, 2010) o que associado a sistemas eficientes de controlo de morfogénese das células e dos tecidos, se apresenta como uma via eficiente para a regeneração de plantas modificadas (Rai *et al.*, 2007; Aslam *et al.*, 2011). A ocorrência de variação somaclonal e a obtenção de híbridos somáticos através da regeneração por embriogénese somática no seguimento da fusão de protoplastos são outros sistemas em que este tipo de regeneração pode ser importante (Corredoira *et al.*, 2003; Kantharajah e Golegaonkar, 2004).

Devido a este vasto conjunto de aplicações da embriogénese somática tem havido um grande estímulo face ao estudo das condições *in vitro* determinantes, tanto na fase de

1. Introdução

indução como em etapas subsequentes, que levam à formação de plantas regeneradas (Gaj, 2004). No entanto, alguns problemas da embriogénese somática como o elevado número de embriões somáticos anómalos produzidos, as baixas taxas de conversão dos embriões em plantas e o potencial reduzido de explantes adultos de sofrerem embriogénese somática continuam a persistir (Canhoto *et al.*, 2009). A fraca qualidade dos embriões resultantes é uma das maiores barreiras para a comercialização da tecnologia da embriogénese somática (Pullman *et al.*, 2003). Outro obstáculo associado à aplicação do sistema de embriogénese somática prende-se com as baixas taxas de indução e com a dificuldade da manutenção da competência embriogénica do material formado, reportado nalgumas espécies, como no castanheiro (Corredoira *et al.*, 2003; Pullman *et al.*, 2003). A baixa sobrevivência das culturas de embriões, o declínio das culturas que leva à diminuição ou mesmo à inexistência da produção de embriões e a incapacidade dos embriões de maturarem totalmente, o que resulta em baixas taxas de germinação ou plântulas com pouco vigor são outras limitações apontadas a esta técnica (Pullman *et al.*, 2003).

A embriogénese somática pode ser induzida em vários tipos de explantes como plântulas e os seus órgãos, pecíolos, limbo, raízes, meristemas, embriões zigóticos e cotilédones (Gaj, 2004).

A fase de indução pode ocorrer numa de duas formas. Pode ser directa e decorrer na superfície de um tecido organizado como uma folha ou um segmento caulinar, isto é, a célula pode ser considerada como pré-determinada para um desenvolvimento embriogénico que apenas necessita de condições apropriadas para permitir a sua expressão (von Arnold *et al.*, 2002) ou pode ser indirecta pelo que há um passo intermédio, de formação de calo. Neste caso, o meio a usar é mais complexo pois deve incluir factores adicionais que conduzam à desdiferenciação e reiniciação da divisão celular de células já diferenciadas antes que estas manifestem a sua competência embriogénica (Jiménez, 2001; Ikeda-Iwai *et al.*, 2003).

1.3.2.3.1- Indução de embriogénese somática em tamarilho

O primeiro relato de embriogénese somática em Solanáceas data de 1965, por Haccius & Lakshmanan (Haccius e Lakshmanan, 1965). No tamarilho, o primeiro registo de sucesso na indução de embriogénese somática em tamarilho ocorreu em 1988, a partir de embriões zigóticos maduros e segmentos do hipocótilo (Guimarães *et al.*, 1988).

1. Introdução

A indução de embriogênese somática e o desenvolvimento embrionário somático em tamarilho já foram concretizados com sucesso recorrendo a vários explantes como embriões zigóticos maduros, cotilédones, hipocótilos, raízes e folhas provenientes da proliferação de meristemas cultivados *in vitro* (Correia *et al.*, 2012).

O tamarilho é uma planta cuja regeneração é um sistema em duas-fases (Fig. 6) (Correia e Canhoto, 2012) isto porque há a formação de calo embriogénico em determinadas condições e o desenvolvimento de embriões é conseguido com condições diferentes (Canhoto, 2010).

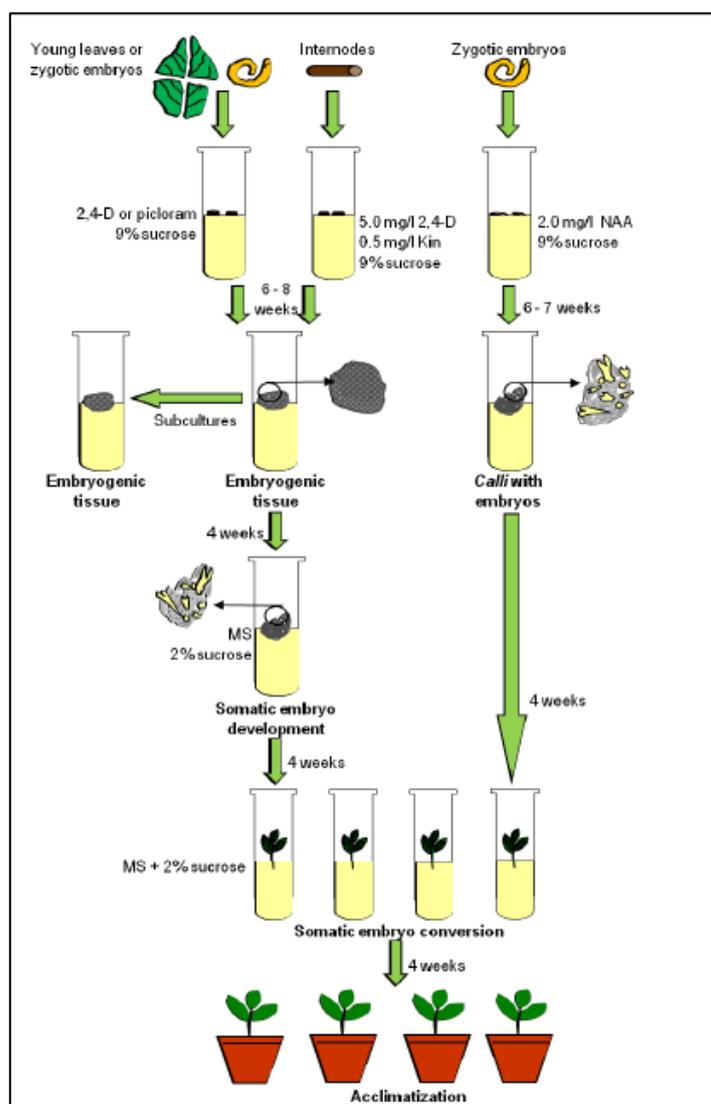


Figura 6- Esquematização geral do processo de embriogênese somática em tamarilho. Imagem adaptada de Canhoto *et al.*, 2005.

Nesse processo, à semelhança do que se observa noutras espécies, verifica-se a formação de dois tipos diferentes de calo (calo embriogénico e calo não embriogénico)

1. Introdução

bem distinguíveis essencialmente pela sua morfologia e pela cor (Correia *et al.*, 2009; Yang e Zhang, 2010; Correia *et al.*, 2011). O calo não embriogénico de tamarilho é caracterizado por ser mais amarelado e friável (Lopes *et al.*, 2000) enquanto o calo embriogénico apresenta um crescimento muito mais lento que o calo não embriogénico (Guimarães *et al.*, 1988).

O calo embriogénico foi, em várias espécies, caracterizado pela presença de agregados nodulares, uma superfície lisa, células normalmente pequenas, isodiamétricas, densamente citoplasmático (Namasivayam, 2007), com paredes celulares espessas, pequenos vacúolos, uma actividade metabólica elevada. As células do último tipo de calo mencionado são designadas como massas pro-embriogénicas ou embriões pré-globulares, por serem compostas por embriões em estádios muito juvenis (Jiménez, 2001). A principal vantagem associada a este tipo de embriogénese prende-se com o facto de poder manter calo embriogénico em cultura, na presença de auxinas, durante longos períodos de tempo, sem aparentes percas de capacidade de produção de embriões (Canhoto, 2010; Guimarães *et al.*, 1988).

No entanto, em tamarilho, nalgumas linhas de células embriogénicas mantidas durante muito tempo foram detectadas variações no número de cromossomas e na quantidade de DNA (Correia e Canhoto, 2012; Currais *et al.* 2013). Estas alterações, que resultam numa redução do potencial dos embriões germinarem, podem-se manifestar após um ano em cultura e a tendência é um aumento destas anomalias com o tempo de cultura (Currais *et al.* 2013).

Em plantas com um tipo de embriogénese somática como aquela que se verifica no tamarilho, as massas pro-embriogénicas só se desenvolvem em embriões somáticos após transferência para um meio sem auxina. Esta fase de desenvolvimento, necessita muitas vezes de ser complementada com uma fase de maturação que permita uma eficaz acumulação de reservas nas células dos embriões somáticos (von Arnold *et al.*, 2002). Trata-se de fases bastante críticas e que são muitas vezes limitantes do sucesso da embriogénese somática (Park *et al.*, 1994; Correia *et al.*, 2012), necessitando portanto de ser optimizadas (Svobodová *et al.*, 1999). Alguns problemas como produção baixa ou assíncrona de embriões, a morfologia anormal ou o desenvolvimento radicular pobre têm sido reportados nesta fase (Montalbán *et al.*, 2010). A ausência de maturação traduz-se,

1. Introdução

muitas vezes, na germinação precoce dos embriões o que leva a reduções significativas na viabilidade das plântulas (Deo *et al.*, 2010).

A formação de embriões somáticos depende essencialmente do meio usado, do estado e das características fisiológicas do explante, do genótipo e do tempo de manutenção do calo, como já foi comprovado em alfarroba, em batateira, em tamarilho, e noutras espécies (García e Martínez, 1995; Canhoto *et al.*, 2005; Canhoto *et al.*, 2006). A remoção de auxinas do meio de cultura tem sido apontada como um importante promotor do desenvolvimento dos embriões somáticos (Stasolla e Yeung, 2003; von Arnold *et al.*, 2002). No entanto, também outras condicionantes como os ambientes nutricional, osmótico e hormonal que envolvem o embrião são factores bem conhecidos no controlo do desenvolvimento do embrião (Pullman *et al.*, 2003).

A fraca acumulação de substâncias de reserva verificada por parte das células dos embriões em desenvolvimento pode ser um dos aspectos que reduz as taxas de conversão de plantas (Canhoto *et al.*, 2012), bem como falhas na maturação (Corredoira *et al.*, 2003).

A fase de germinação pode ser definida como sendo o desenvolvimento dos embriões somáticos em plantas de genótipo idêntico ao do explante que lhes deu origem, capazes de se desenvolverem e crescerem *ex vitro*, tendo já uma raiz, uma gema apical e os órgãos formados (Nawrot-Chorabik, 2012).

Alguns autores têm estudado a influência de tratamentos pré-germinativos, a qualidade da luz ou a posição do explante no meio de modo a tentar rentabilizar mais a técnica (Montalbán *et al.*, 2010). Em tamarilho, a germinação de embriões somáticos é, regra geral, conseguida com a sua transferência para meio sem hormonas (Correia *et al.*, 2012).

Os primeiros sinais de germinação dos embriões somáticos expressam-se normalmente pela aquisição de um tom esverdeado dos cotilédones e pelo alongamento da radícula (Canhoto *et al.*, 1999). Uma germinação apropriada resulta no crescimento simultâneo e balanceado da parte caulinar e da parte radicular essencial para o sucesso da aclimatização (Park *et al.*, 1994).

A frequência de embriões que germinam e são convertidos em plantas, em lenhosas, é muito baixa e continua a ser um dos maiores obstáculos para aplicações industriais do processo de embriogénese somática (Linossier *et al.*, 1997), podendo estar

1. Introdução

associada a uma embriogênese onómala e à ausência de um meristema caulinar bem organizado (Troche *et al.*, 2009). A aparência dos embriões somáticos parece ser um indicador importante para a germinação, em noqueira os embriões translúcidos são incapazes de germinar (Cailloux *et al.*, 1996).

A fase de aclimatização pode ser considerada como uma preparação das plântulas formadas às condições *ex vitro* (Nawrot-Chorabik, 2012). A sobrevivência e o crescimento de plantas regeneradas, nesta fase, estão estritamente relacionados com as condições impostas em estados de desenvolvimento anteriores, quando se formam embriões maduros e quando estes germinam (von Arnold *et al.*, 2002). Altas frequências de formação de embriões somáticos são pouco valiosas a não ser que uma grande parte destes embriões seja capaz de se desenvolverem em plantas normais (Deo *et al.*, 2010).

Embriões maduros com uma morfologia normal, que tenham acumulado substâncias de reserva suficientes e que tenham adquirido tolerância à dessecação no final da maturação desenvolvem-se, à partida, em plantas normais e chegam a esta fase (von Arnold *et al.*, 2002). No entanto deve ser realçado que nem sempre uma morfologia anormal resulta numa diminuição das hipóteses do embrião regenerar uma planta (Gaj, 2004). Em tamarilho já foram reportados relatos de plântulas com anormalidades morfológicas expressas em estados iniciais, que após o desenvolvimento, recuperaram um fenótipo normal (Correia *et al.*, 2012). Ainda se pode verificar o caso de embriões aparentemente normais não regenerem plantas, o que pode estar relacionado com alterações na estrutura do meristema apical caulinar, com alterações genéticas ou fisiológicas ou com algum tipo de dormência (Canhoto, 2010).

1.4- Objectivos

A cultura de tecidos veio trazer novas potencialidades no que toca ao melhoramento vegetal. Esta técnica, aliada aos métodos convencionais já existentes, pode ser a mais um contributo para o aumento da produção em muitas espécies. No entanto têm sido relatados alguns problemas associados a esta técnica. O nosso laboratório reportou dificuldades no que diz respeito à cultura de tecidos de material adulto, devido à sua recalcitrância e

1. Introdução

dificuldades em regenerar plantas adultas por meio da embriogénese somática, devido a anomalias ocorridas em fases específicas do processo.

Embora no nosso laboratório já tenha sido estabelecido um protocolo para a clonagem de uma planta adulta de *Cyphomadra betacea*, via indução de embriogénese somática ainda nada foi observado no que diz respeito à indução de organogénese a partir de material derivado da planta adulta.

Neste trabalho foram testados dois meios distintos para a indução de organogénese, já experimentados em trabalhos anteriores, em explantes com origem seminal que resultaram em plantas fenotipicamente normais. Contudo no presente trabalho, os explantes têm origem em material adulto estabelecido em culturas *in vitro* de modo a avaliar a sua aplicabilidade em processos de clonagem de árvores adultas.

Este trabalho tem também como objectivo otimizar o processo de embriogénese somática, mais particularmente a etapa de maturação dos embriões somáticos, em calo de três genótipos diferentes de tamarilho, dois com origem seminal, com diferentes idades e um com origem na planta adulta, introduzindo algumas variáveis no meio base MS, como a alteração do teor de sacarose disponibilizada no meio, a introdução de outros compostos instigadores de stress (PEG e peróxido de hidrogénio), a adição de ABA ao meio e a incorporação de carvão activado. Análises morfológicas e histológicas complementaram os ensaios de cultura *in vitro*.

2. Materiais e métodos



2.1. - Material Vegetal

2.2.1- Plantas de tamarilho estabelecidas *in vitro*

Na realização deste trabalho utilizou-se material vegetal previamente estabelecido *in vitro* (Correia *et al.*, 2011) através de cultura de meristemas obtidos a partir dos segmentos nodais de uma planta de tamarilho vermelho com cerca de 15 anos (Fig. 7a), localizada no Jardim Botânico de Coimbra (JBUC). Esta linha estabelecida a partir de uma planta adulta designou-se TJ.

Para além da linha TJ, foram também utilizados clones de tamarilho vermelho (TV), tamarilho amarelo (TA) e tamarilho laranja (TL) com origem seminal. Para o estabelecimento destas linhas, as sementes isoladas de frutos maduros (Fig. 7b) e desinfectadas numa solução de hipoclorito de cálcio 7% (w/v) durante 20 minutos, foram germinadas em meio base MS (Murashige e Skoog, 1962), com 30 g/l de sacarose e 0,6% (w/v) de agar, sem reguladores de crescimento. Após a germinação, seguiu-se a micropropagação através da cultura sucessiva de ápices meristemáticos e segmentos nodais (1,5 cm) em tubos de ensaio com meio de proliferação de rebentos, meio MS, com 0,2 mg/l de benziladenina (BA), 30 g/l de sacarose e 0,6% (w/v) de agar (Fig.7c).

Todas as culturas estabelecidas foram subcultivadas mensalmente em meio de cultura fresco com a mesma composição do meio de proliferação de rebentos e mantidos numa câmara de crescimento, a $24\pm 1^{\circ}\text{C}$, sob um fotoperíodo de 16h de luz ($15\text{-}20\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$) e 8h escuro.



Figura 7- Proveniência do material vegetal utilizado neste trabalho. **a)** Árvore de tamarilho vermelho com cerca de 15 anos existente no Jardim Botânico da Universidade de Coimbra, a partir da qual foi iniciada a cultura de meristemas para o estabelecimento da linha TJ. **b)** Ramo jovem, da planta adulta, com frutos maduros recolhidos para isolamento de sementes. **c)** Linha TV estabelecida *in vitro* a partir da micropropagação de uma planta obtida por via seminal.

2.2.2- Tecido embriogénico

Nos ensaios de maturação de embriões somáticos a partir de tecido embriogénico realizados foram utilizados 3 linhas embriogénicas (Fig. 8) previamente induzidas e mantidas em cultura. A indução de embriogénese somática para obtenção dessas linhas foi feita a partir de explantes foliares de tamarilho vermelho (TV) em meio MS, suplementado com 90 g/l de sacarose e 5 mg/l de picloram. O tecido embriogénico obtido após 12 semanas de cultura, foi multiplicado no mesmo meio em subculturas de 6 semanas (Correia *et al.*, 2011). As diferentes linhas de tecido embriogénico utilizadas foram designadas por: TV-CE1 (Fig. 8a), induzido em 2007, TV-CE2 (Fig. 8b), obtido em 2010 e TJ-CE3 (Fig. 8c), este último proveniente de indução de embriogénese somática em explantes foliares de material adulto estabelecido *in vitro* (Correia *et al.*, 2011).



Figura 8- Tipos de tecido embriogénico utilizados nos ensaios: a) linha TV-CE1, b) linha TV-CE2 e c) linha TJ-CE3. As barras correspondem a 3 mm.

2.2- Métodos

2.1- Micropropagação das plantas estabelecidas *in vitro*

As plantas previamente estabelecidas *in vitro*, tanto por via seminal, como no caso dos diferentes cultivares de tamarilho amarelo (linha TA), laranja (linha TL) e vermelho (linha TV), como a partir de ramos jovens da planta adulta (linha TJ), foram micropropagadas a partir da proliferação de meristemas axilares. Os segmentos nodais foram inoculados em meio base MS, com 30 g/l de sacarose e 0,2 mg/l de BA. O pH foi ajustado a 5,6-5,8, e os meios solidificados com 0,6% de agar e autoclavados a 121° C, durante 20 minutos. Foi inoculado um segmento nodal por tubo de ensaio contendo 15 ml de meio de cultura (Fig. 9). As culturas foram colocadas em câmara de crescimento, a 24±1 °C, com 80-90% de humidade relativa e um fotoperíodo de 16h luz / 8h escuro, sendo a intensidade luminosa 15-20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Este material foi subcultivado mensalmente de forma a haver sempre material estabelecido *in vitro* disponível para a realização de ensaios de embriogénese somática ou de organogénese.

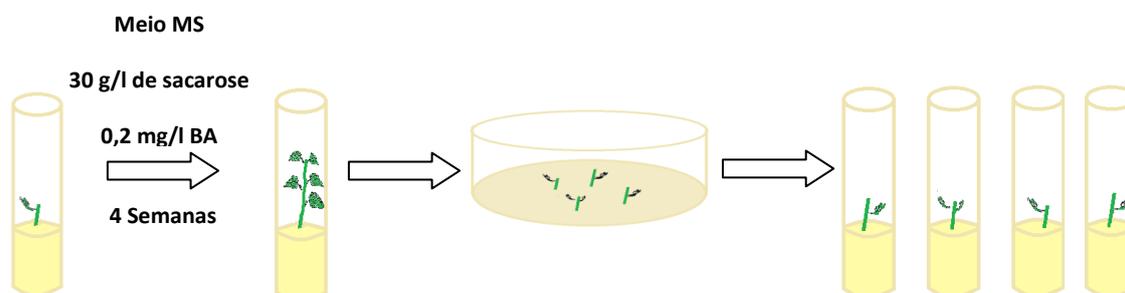


Figura 9- Esquema síntese dos ensaios de indução de embriogénese somática realizados neste trabalho.

2.2- Indução de organogénese

A indução de organogénese foi feita em segmentos foliares jovens de rebentos micropropagados da linha TJ e a selecção dos meios a testar teve como base trabalhos de organogénese anteriormente desenvolvidos no Laboratório de Biotecnologia da FCTUC (Santos, 2012). O procedimento seguido consistiu na excisão das folhas da parte apical da plântula, as quais, após remoção da nervura central, foram divididas em quatro partes equivalentes. Cada uma das fracções foi colocada num tubo de ensaio (15 x 2,2 cm), com a parte abaxial em contacto com o meio de indução de organogénese (TO), meio base MS, com 30 g/l de sacarose e reguladores de crescimento. Testaram-se duas combinações de reguladores de crescimento: o meio TO1, com 1 mg/l de BA e 0,25 mg/l de NAA, e o meio TO2, contendo unicamente 1mg/l de BA. O pH dos meios de cultura foi ajustado entre 5,6 e 5,8, gelificados com 0,6% (w/v) de agar e autoclavados a 121°C durante 20 minutos. Foram efectuadas 3 réplicas por tratamento, cada uma com 10-12 explantes. As culturas foram feitas em estufa a 24±1°C, com uma intensidade luminosa de 15 – 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR e um fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, durante 8 semanas, e monitorizadas de 2 em 2 semanas, para registo de alterações morfológicas. Os rebentos formados foram colocados em meio MS com 30 g/l de sacarose e 0,2 mg/l de BA, nas mesmas condições de incubação.

2.3- Indução de embriogénese somática

Nos ensaios de indução de embriogénese somática foram utilizados explantes foliares obtidos das plântulas micropropagadas de tamarilho vermelho (linha TV), amarelo (linha TA) e laranja (linha TL). As folhas apicais mais jovens e mais expandidas, com aproximadamente 1,5 cm de comprimento, foram excisadas dos rebentos caulinares e tratadas segundo dois procedimentos distintos (Fig. 10).

No primeiro procedimento, foram excisadas folhas das 3 linhas (TV, TA e TL), que foram seccionadas em 4 segmentos, e nos quais a parte abaxial foi ferida, aleatoriamente, com a ponta do bisturi. Cada um dos segmentos foi colocado num tubo de ensaio com a superfície ferida em contacto com o meio de indução (meio TI1, Tabela 1).

No segundo procedimento, foram apenas utilizadas folhas da linha TV como explantes, tendo sido fragmentadas em porções de pequenas dimensões (3 a 10 mm) e o conjunto das pequenas secções correspondentes a um quarto da folha colocados num tubo

2. Materiais e Métodos

de ensaio com o respectivo meio de indução (Tabela 1). Para todos os meios de cultura utilizados, o pH do meio foi ajustado a 5,6 – 5,8, gelificados com 0,25% (w/v) de Phytigel (Sigma) e autoclavados a 121°C durante 20 minutos. As culturas foram incubadas em estufa a 24±1°C, ao escuro, durante 12 semanas. Após este período de tempo foi avaliada a capacidade dos explantes de formar tecido embriogénico e calo não embriogénico.

Tabela 1- Composição dos meios de cultura utilizados na indução de embriogénese somática em explantes foliares de tamarilho.

Nome do meio	Auxina	Concentração de auxina (mg/l)	Sacarose (g/l)
TI1	Picloram	5	90
TI2	2,4-D	2	90
TI3	Picloram	5	30
TI4	2,4-D	2	30
TI5	Picloram	2	30
TI6	2,4-D	1	30

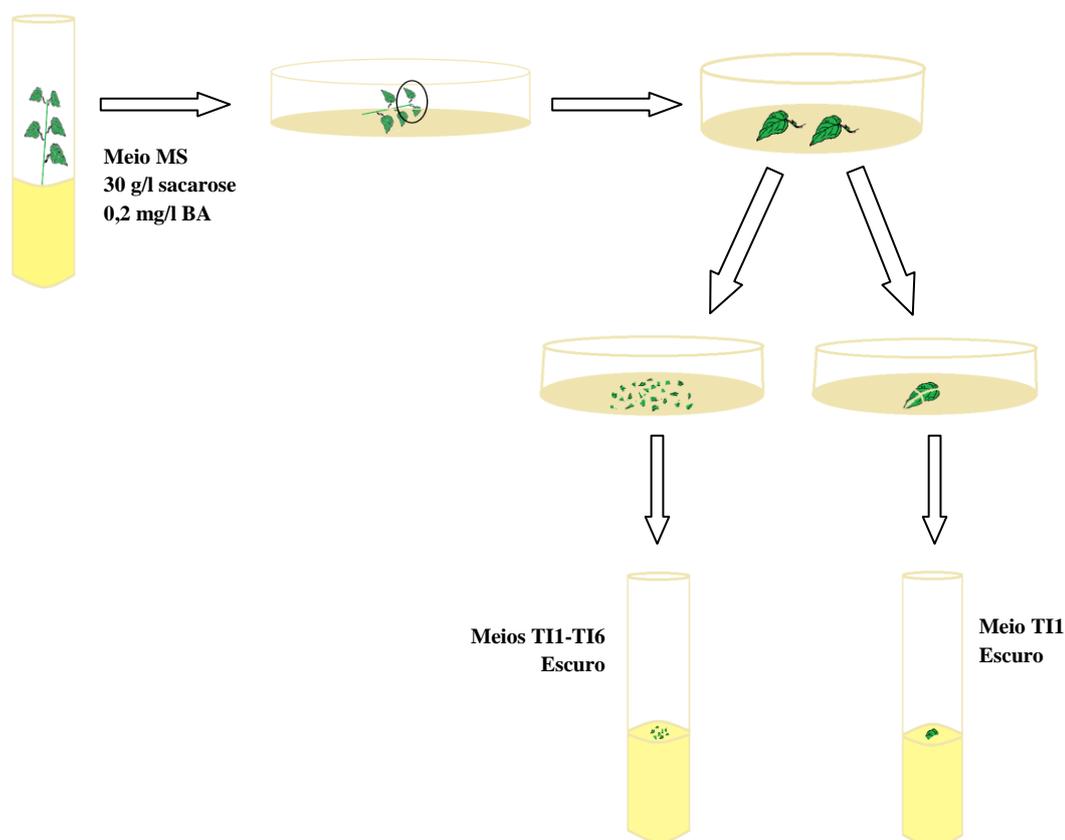


Figura 10- Esquema síntese dos ensaios de indução de embriogénese somática realizados.

2.4- Maturação de embriões somáticos

Nos ensaios de maturação de embriões somáticos foram utilizadas massas de tecido embriogénico (obtidas das linhas TV-CE1, TV-CE2 e TJ-CE3) com cerca de 50 mg, que foram inoculadas em tubos de ensaio (15x2,2 cm) com 15 ml de meio de maturação (TM). Os diferentes meios de maturação testados (Tabela 2) consistiram em meio base MS, suplementado com diferentes agentes osmóticos, como a sacarose e o polietileno glicol 4000 (PEG 4000), reguladores de crescimento, como o ácido abscísico (ABA), carvão activado (CA) e agentes indutores de stresse oxidativo, como o peróxido de hidrogénio (H₂O₂). Todos os meios foram solidificados com 0,6% (w/v) de agar, o pH ajustado para 5,6 – 5,8 e autoclavados a 121°C durante 20 minutos. Realizaram-se 3 réplicas por tratamento, com 6 explantes por réplica, excepto para os tratamentos TMA, para os quais não foram feitas réplicas.

A preparação dos meios de maturação com PEG 4000 (TMP1 e TMP2, Tabela 2) implicou um procedimento distinto do dos restantes meios, tendo sido preparadas duas soluções separadamente, uma delas com os constituintes do meio MS, a sacarose e o agar com o dobro da concentração relativamente à concentração final no meio de cultura, e outra solução de PEG 4000 também com o dobro da concentração. Ambas as soluções foram preparadas com igual volume, o seu pH foi fixo entre 5,6 e 5,8, e só após a autoclavagem as duas soluções foram misturadas.

Na preparação dos meios com H₂O₂ (TMH1, TMH2 e TMH3, Tabela 2), após a autoclavagem, adicionou-se Peridrol a 30%, previamente esterilizado por filtração (filtros Millipore, com uma membrana de 0,22 µm) de modo a perfazer as diferentes concentrações finais de H₂O₂.

A maturação decorreu em estufa a 24±1°C, ao escuro, durante 4 semanas, período após o qual os embriões foram isolados, contabilizados e analisados em termos da sua qualidade e morfologia de acordo com a seguinte classificação:

- **sinal negativo (-)** – tratamento no qual não se desenvolveram embriões somáticos;
- **sinal positivo (+)** – tratamento com formação de embriões somáticos com baixa qualidade (embriões translúcidos e com elevada incidência de anomalias);

2. Materiais e Métodos

- **sinal positivo** (+++++) – tratamento com formação de embriões somáticos com melhor qualidade (embriões com tonalidade branca opaca e menor incidência de anomalias);

Nestes ensaios o meio TM2 foi usado como controlo, sendo o meio que é vulgarmente utilizado para conseguir a maturação de embriões somáticos (Correia *et al.*, 2012).

Após contabilização e análise, os embriões foram transferidos para meio de germinação (meio TG, ver secção 2.2.6).

Tabela 2- Tabela síntese dos meios de maturação testados.

Designação do meio	Meio de maturação (meio base MS, sem auxinas)				
	Sacarose (g/l)	PEG 4000 (g/l)	Carvão Activado (mg/l)	H ₂ O ₂ (µM)	ABA (mg/l)
TM1	25	-	-	-	
TM2	40	-	-	-	
TMP1	25	25	-	-	
TMP2	40	25	-	-	
TMC	40	-	10	-	
TMH1	40	-	-	50	
TMH2	40	-	-	100	
TMH3	40	-	-	200	
TMA1	40	-	-	-	1
TMA2	40	-	-	-	2
TMA3	40	-	-	-	4

2.5- Maturação de embriões somáticos a partir de culturas de tecido embriogénico obtido em suspensões celulares

Paralelamente aos ensaios de maturação em meio gelificado, foram também realizados ensaios de maturação de embriões somáticos a partir de tecido embriogénico multiplicado em meio líquido. Massas de tecido embriogénico das linhas TV-CE1 e TV-CE2, com aproximadamente 500 mg, foram multiplicadas em 50 ml de meio líquido MS com 90 g/l sacarose e 9 mg/l de picloram, durante duas semanas, em Erlenmeyers de 100 ml, no escuro, numa incubadora com agitação orbital, a 25°C e 80 rpm. Após as 2 semanas de cultura, as suspensões celulares foram sedimentadas por centrifugação, durante 5 minutos a 300 rpm, de modo a permitir a separação entre a fase sólida e a fase líquida e a possibilitar o isolamento das massas embriogénicas (Fig. 11).

2. Materiais e Métodos

Após este procedimento, as massas de tecido embriogénico foram transferidas para meios de maturação líquidos com composição semelhante aos meios TMS2 E TMC (Tabela 2). Tal como nos procedimentos anteriores, os meios de cultura foram ajustados a um pH de 5,6-5,8 e autoclavados a 121°C durante 20 minutos.

O período de maturação ocorreu também em incubadora com agitação orbital, nas mesmas condições acima referidas, durante 4 semanas. Ao fim deste período procedeu-se a uma sedimentação por centrifugação idêntica à referida anteriormente sendo de seguida da contabilização do número de embriões e classificação de acordo com a escala qualitativa referida na secção 2.2.4. Após análise os embriões foram transferidos para meio de germinação (meio TG, ver secção 2.2.6).

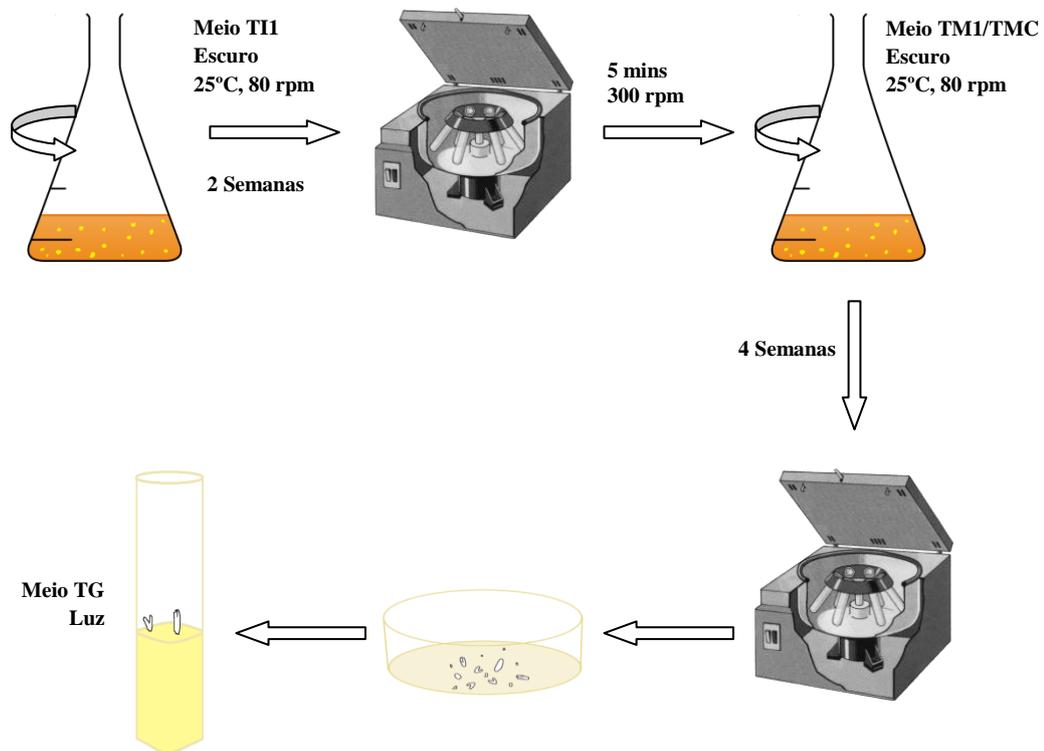


Figura 11- Esquema do processo de maturação em meio líquido e isolamento de embriões.

2.6- Germinação dos embriões somáticos

Após 4 semanas em condições de maturação, os embriões formados foram transferidos para meio de germinação (TG) constituído pelo meio base MS, com 25 g/l de sacarose, sem reguladores de crescimento e com pH estabelecido entre 5,6 e 5,8. O meio foi

2. Materiais e Métodos

autoclavado a 121°C durante 20 minutos. Foram inoculados 3 a 4 embriões em cada tubo de ensaio, e colocados numa câmara de crescimento a 24±1°C, com um fotoperíodo de 16h luz / 8h escuro, sendo a intensidade luminosa 15-20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.7- Análises morfológicas e histológicas

Para a análise morfológica e histológica das linhas embriogénicas induzidas e em fase de maturação e germinação, procedeu-se a uma fixação de tecidos em diferentes fases (Fig. 12): i) massas de tecido embriogénico em formação (Fig. 12a), ii) massas proembriogénicas (Fig. 12b), iii) calo presente em meio de germinação (Fig. 12c) e iv) embriões somáticos (Fig. 12d). O material foi fixado numa solução de glutaraldeído a 2,5% (v/v) em tampão cacodilato de cálcio 0,1M, de pH 6,8, com umas gotas de solução de cloreto de cálcio 0,01M, durante cerca de 2h, à temperatura ambiente, seguido de 3 lavagens no mesmo tampão, tendo cada lavagem a duração de 15 minutos.

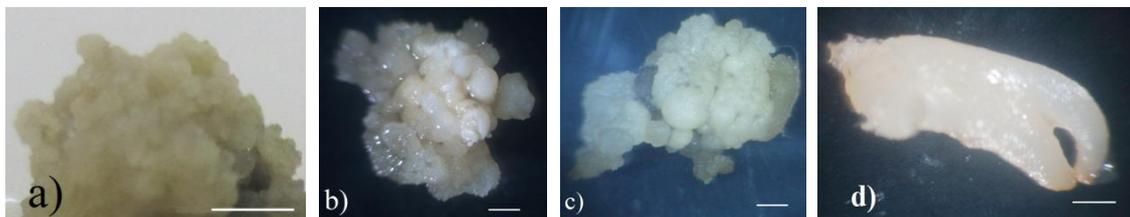


Figura 12- Tecidos em diferentes fases utilizados para as análises histológicas: **a)** massas de tecido embriogénico em formação, **b)** massas pro-embriogénicas, **c)** calo presente em meio de germinação e **d)** embrião somático em meio TMP1. As barras correspondem a 2 mm.

Seguiu-se uma pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% (p/v), preparado no mesmo tampão, à temperatura ambiente, durante 2 horas. As amostras foram lavadas com água destilada, durante 15 minutos, perfazendo um total de 3 lavagens e desidratadas numa série crescente de etanol (70, 80, 2x 95 e 3x 100%).

Concluídas estas etapas, o material desidratado foi impregnado em três misturas sucessivas de etanol 100% e resina (Spurr, 1969), nas porções de 2:1, 1:1 e 1:2, 2h cada e uma noite em resina pura. Os blocos de resina com as amostras polimerizaram em moldes, durante 24 horas, numa estufa a 60°C.

2. Materiais e Métodos

Depois de os blocos polimerizarem foram feitos cortes semi-finos (1-2 μm), no ultramicrotomo LKB Ultratome III com facas de vidro. Os cortes foram transferidos para uma lâmina de vidro, com uma gota de água destilada e foram a secar a 60°C. O material foi corado com uma solução de azul de toluidina, durante 30 minutos, à temperatura ambiente e lavado, de forma a retirar o excesso de corante.

Para as observações em microscopia electrónica de varrimento, o procedimento foi igual até à fase da desidratação em etanol. A partir desta fase, as amostras sofreram secagem pelo método do ponto crítico, a 40°C, seguida de metalização com ouro paládio numa unidade JEOL JFC-1100 (1,2 Kv, 10 mA, 11 min). As observações realizaram-se num microscópio electrónico de varrimento JEOL JSM 5400 (15Kv), tendo sido captadas as imagens com interesse.

2.8- Medição dos níveis de peróxido de hidrogénio endógeno das linhas embriogénicas

Para a realização destes ensaios foi seguido o protocolo indicado por Ma (2012). Utilizaram-se as linhas embriogénicas em estudo, TV-CE1, TV-CE2 e TJ-CE3 e como controlo, uma linha de calo não embriogénico (CNEB), obtida no mesmo ensaio de indução de embriogénese somática que a linha TV-CE1, estando portanto a ser mantida em cultura desde 2007. Três réplicas (0,5 g cada) dos 4 tipos de material vegetal, foram homogeneizadas em 1,5 ml de acetona gelada e centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos. De seguida adicionou-se 0,1 ml de TiSO_4 a 5% (v/v) a 1 ml do sobrenadante. A solução foi incubada em agitação enquanto 0,2 ml de NH_4OH foram adicionados, gota a gota. A mistura foi a centrifugar durante 10 minutos a 3000 rpm e o precipitado foi lavado com 2 ml de acetona até que se apresentasse limpo e descorado. Após lavagem, o precipitado foi solubilizado em 1 ml de H_2SO_4 2N e filtrado antes de se medir a absorvância a 415 nm, face a um branco que passou pelo mesmo procedimento. A curva padrão de H_2O_2 foi obtida numa gama de concentrações de 0 a 100 $\mu\text{mol/l}$, tendo as várias soluções seguido o mesmo procedimento adoptado, com a adição de 0,1 ml de TiSO_4 a 5% (v/v).

3. Resultados



3.1- Indução de organogênese

A indução de organogênese, como anteriormente referido (ver secção 2.2.2), foi realizada em explantes foliares da linha TJ, nos meios de cultura TO1 e TO2, meios base MS com 30 g/l de sacarose e a adição de reguladores de crescimento.

No primeiro ensaio realizado, com meio TO1, com BA (1 mg/l) e NAA (0,25 mg/l), passadas duas semanas de cultura começaram a observar-se alterações na superfície do explante, como o escurecimento e enrugamento (Fig. 13a). Com o decorrer do ensaio estas alterações tornaram-se mais evidentes (Fig. 13b) e, após 7 semanas de cultura, a maioria dos explantes apresentava-se oxidado e sem sinais de formação de gemas (Fig. 13c). Observou-se também a formação de calo na periferia dos explantes. O material foi mantido nestas condições até completar as 10 semanas em cultura, mas a partir da 7^a semana já não se registaram mais alterações para além do aumento da oxidação e consequente morte dos explantes.

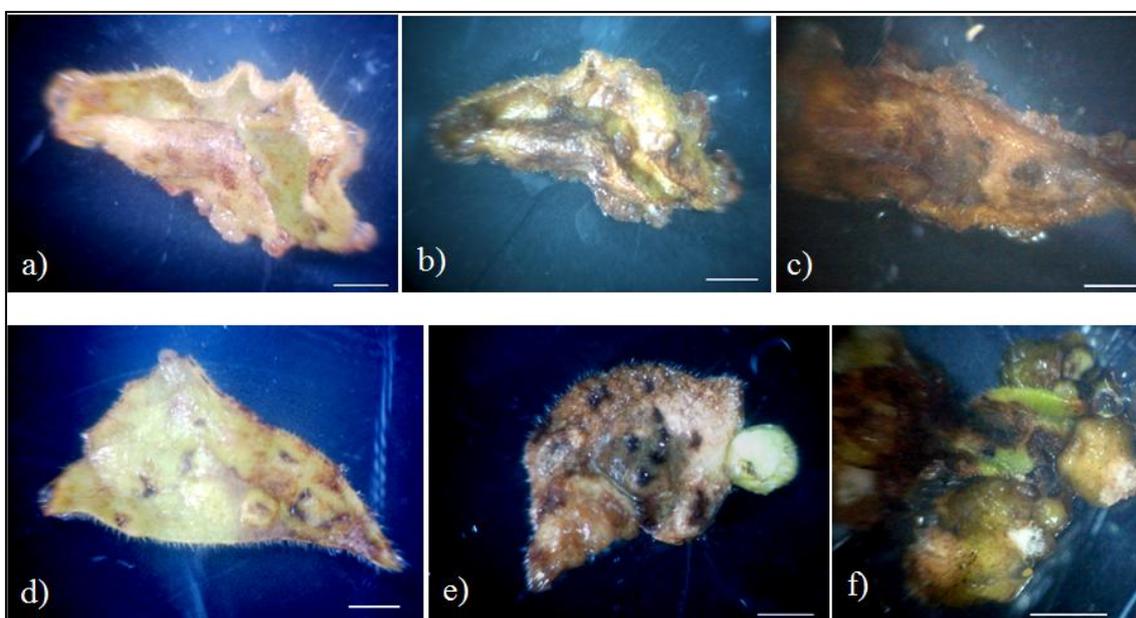


Figura 13- Ensaio de organogênese em meio TO1 (a-c) e em meio TO2 (d-f). As imagens a) e d) correspondem ao desenvolvimento do explante após 2 semanas, as imagens b) e e) ao desenvolvimento às 5 semanas e em c) e f) está ilustrada a resposta observada após 7 semanas em meio de indução de organogênese. As barras correspondem a 5 mm.

No segundo ensaio, em meio TO2, onde se utilizou apenas BA (1 mg/l), os explantes apresentaram-se menos oxidados (Fig. 13d) e a partir da quarta semana começaram a surgir gemas (Fig. 13e), contudo não se verificou o desenvolvimento destas

3. Resultados

estruturas. Neste ensaio também se verificou a formação de calo na grande maioria dos explantes, apesar de em menor quantidade comparativamente ao ensaio em meio TO1. À semelhança do que se observou no ensaio anterior, os explantes começaram a exibir um elevado grau de oxidação a partir da 7ª semana (Fig. 13f), tendo sido mantidos em cultura durante 10 semanas.

As gemas formadas nos explantes inoculados em meio TO2, após as 10 semanas, não se encontravam oxidadas mas também não se desenvolveram mais que o observado às 7 semanas (Fig. 13e). Ocorreu indução de gemas numa média de $43,69\% \pm 25,49\%$ dos explantes. Estas estruturas foram isoladas do explante original e colocadas em meio MS com 30 g/l de sacarose e 0,2 mg/l de BA de forma a promover o seu desenvolvimento. Após 6 semanas neste meio, 2 das 15 (13,3 %) gemas inoculadas desenvolveram-se em rebentos caulinares (Fig. 14).

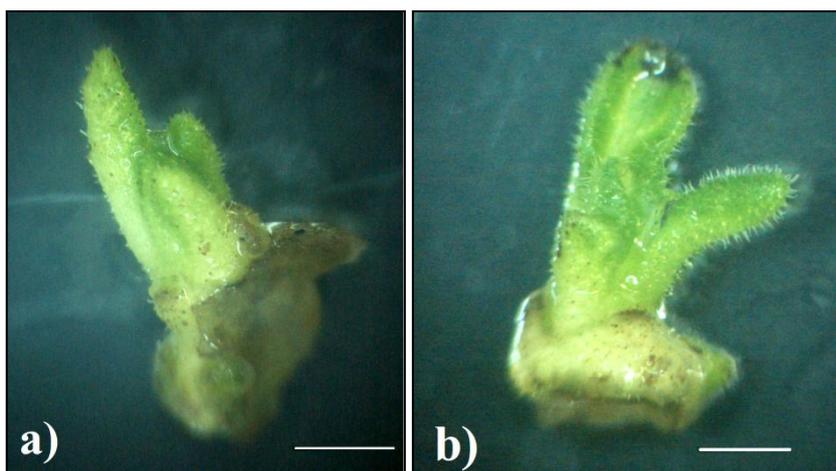


Figura 14- Rebentos obtidos a partir das gemas formadas em meio TO2. As barras correspondem a 3mm.

3.2- Indução de embriogénese somática

Tal como indicado na secção 2.2.3, a indução de embriogénese somática (ES) foi conseguida seguindo dois procedimentos diferentes.

3. Resultados

No primeiro procedimento, foram testadas três linhas distintas, correspondentes a três genótipos, um de tamarilho vermelho (TV), um de tamarilho amarelo (TA) e outro de tamarilho laranja (TL), estabelecidos em trabalhos anteriores no Laboratório de Biotecnologia da FCTUC. Como explantes, foram utilizadas porções equivalentes a um quarto de uma folha, por tubo de ensaio, em meio de indução TI1 (meio base MS suplementado com 90 g/l de sacarose e 5 mg/l de picloram). Após 12 semanas neste meio começaram a surgir, no mesmo explante, dois tipos diferentes de calo. Um deles predominante e com aspecto mais friável e amarelado, sendo designado de calo não embriogénico, e o outro tipo de calo, branco e organizado em aglomerados compactos, com um crescimento mais lento, sendo designado de calo embriogénico (Fig. 15).

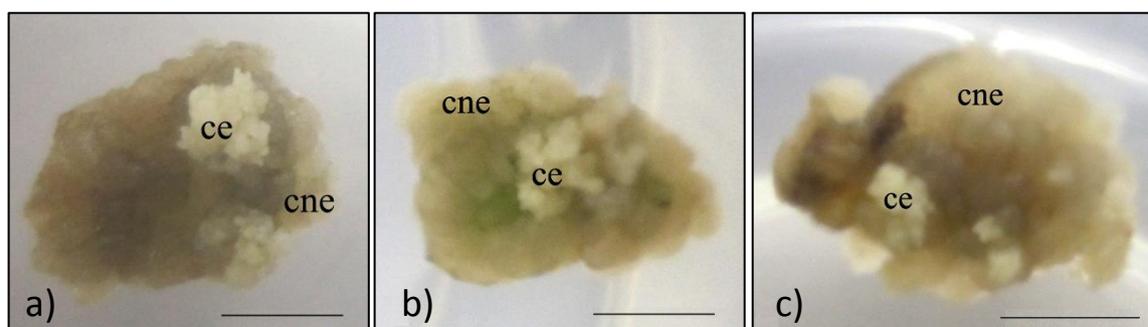


Figura 15- Calo embriogénico (ce) e não embriogénico (cne) formado em meio TI1, a partir dos explantes foliares de TA (a), TL (b) e TV (c). É possível distinguir nitidamente a presença de calo embriogénico (ce) e calo não embriogénico (cne) no mesmo explante. As barras correspondem a 0,5 cm.

Tabela 3- Taxas de indução de calo embriogénico em meio TI1, nos vários genótipos de tamarilho. Os valores apresentados são a média (\pm desvio padrão) de 3 réplicas (30 explantes cada).

Genótipo	Taxas de indução de calo embriogénico (%)
TA	61,88 \pm 9,72
TL	52,31 \pm 14,42
TV	67,50 \pm 10,61

Verificou-se que o calo embriogénico formado tinha um aspecto semelhante nos explantes induzidos dos diferentes genótipos, como se pode comprovar mediante a observação da figura 15.

No que diz respeito às taxas de indução de calo embriogénico estas variaram de acordo com o genótipo. Os explantes TL revelaram uma menor eficácia na formação de

3. Resultados

calo embriogénico quando comparado com TV e TA, com taxas de indução na ordem dos 50%. Das três linhas testadas foi a de TV a que apresentou formação de calo embriogénico num número superior de explantes foliares (Tabela 3).

No segundo procedimento, em que foram utilizadas folhas de tamarilho vermelho (TV) fragmentadas em secções com 3 – 10 mm, os resultados foram similares aos apresentados no primeiro ensaio, na medida em que se verificou a formação dos dois tipos de calo, embriogénico e não embriogénico, a partir do mesmo explante, como representado nas figuras 16 a e b. No entanto, apenas se verificou a formação de calo embriogénico quando se utilizaram os meios de cultura TI1 e TI2, com 90 g/l de sacarose (Fig. 16 a, b; Tabela 4), e quando a concentração deste composto foi reduzida para 30 g/l, independentemente da auxina presente, apenas ocorreu a formação de calo não embriogénico (Fig. 16 c – f).

Quando se utilizou a menor concentração de 2,4-D (1 mg/l) com uma quantidade de sacarose reduzida (30 g/l) formou-se um calo visualmente semelhante a calo não embriogénico (Fig. 16 f), mas rígido, não friável e de tonalidade mais esbranquiçada. Contudo, quando o 2,4-D foi utilizado em concentrações de 2 mg/l (tratamento TI2, Tabela 4) revelou ser uma auxina mais eficaz na indução de calo embriogénico, comparativamente ao picloram (tratamento TI1, Tabela 4), permitindo taxas de indução mais elevadas nos explantes fragmentados.

Por comparação dos resultados obtidos quando se utilizaram explantes inteiros e explantes fragmentados da linha TV, induzidos no mesmo meio de cultura (TI1), foi possível observar taxas de indução semelhantes, ambas acima dos 65% (Tabelas 3 e 4). No entanto, há que ter em conta que as taxas de indução apresentadas se referem à percentagem de explantes em que ocorreu a formação de calo embriogénico, e não à quantidade de calo formado por explante, que apesar de não ter sido quantificada neste trabalho, segundo o que se constatou visualmente, foi superior nos explantes induzidos de acordo com o segundo procedimento.

3. Resultados

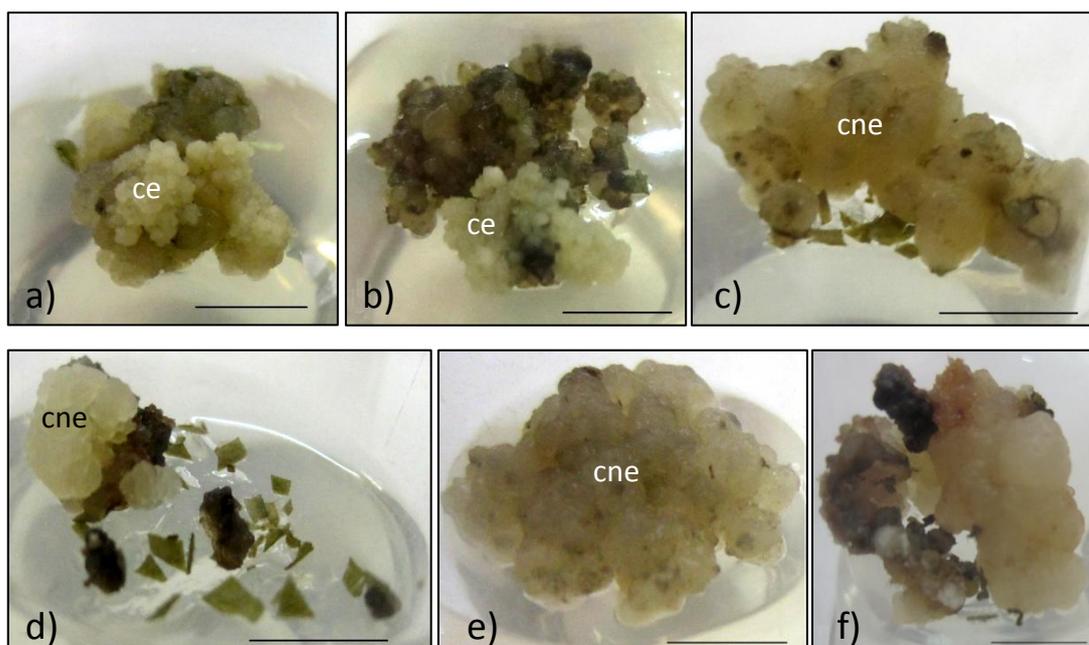


Figura 16- Indução de calo embriogénico em explantes foliares de TV fragmentados (3 – 10 mm). Resposta dos explantes em meio TS1 (a), TS2 (b), TS3 (c), TS4 (d), TS5 (e) e TS6 (f). As barras correspondem a 0,5 cm.

Tabela 4- Taxas de indução de calo embriogénico em explantes foliares fragmentados (3 – 10 mm) de tamarilho vermelho (TV) para os vários meios de indução testados.

Meio de indução	Taxas de indução de calo embriogénico (%)
TI1	68,75
TI2	75,00
TI3	0,00
TI4	0,00
TI5	0,00
TI6	0,00

3.3- Maturação dos embriões somáticos

A eficácia de diversos tratamentos na maturação de embriões somáticos foi avaliada recorrendo a 3 linhas embriogénicas induzidas em diferentes alturas e/ou com diferentes origens. A resposta das diferentes linhas nos vários tratamentos foi avaliada quer em termos quantitativos, pela contabilização do número de embriões somáticos normais e anómalos formados para cada tratamento, quer em termos qualitativos, pela avaliação da qualidade (opacidade e anomalias) dos embriões formados (ver secção 2.2.4).

A partir da quantificação do número de embriões somáticos fenotipicamente normais, face ao número total de embriões somáticos formados por tratamento, foi possível

3. Resultados

verificar que o tratamento TMP1 (com uma combinação de 25 g/l de sacarose e 25 g/l de PEG 4000) foi o que garantiu os melhores resultados, apresentando as percentagens de embriões normais mais elevadas, tanto para a linha TV-CE1, como para a TV-CE2, com taxas a rondar os 37% e os 43%, respectivamente (Tabela 5). Os meios TMP2, TMH1 e TMH2, foram deste ponto de vista, as condições menos eficientes, para o calo embriogénico TV-CE1, com taxas a rondar os 20% de embriões normais e o meio TM2 o menos eficiente na formação de embriões normais, no TV-CE2, com taxas à volta dos 10%.

Das 3 linhas embriogénicas testadas, apenas a linha TV-CE1 respondeu com a formação de embriões somáticos em todos os tratamentos, sendo de salientar o facto de a linha TJ-CE3 não ter desenvolvido embriões somáticos para nenhum dos tratamentos aplicados.

Tabela 5- Percentagem de embriões normais formados em cada tratamento em meio sólido, tendo em conta a linha embriogénica utilizada. Cada valor representa a média \pm desvio padrão de 3 réplicas (6 explantes por réplica), excepto para os tratamentos TMA, para os quais não foram feitas réplicas.

Meio de maturação	TV-CE1 (%)	TV-CE2 (%)	TJ-CE3 (%)
TM1	34,23 \pm 11,06	17,69 \pm 23,66	0.0 \pm 0,0
TM2	25,64 \pm 12,58	10,48 \pm 12,54	0.0 \pm 0,0
TMP1	36,88 \pm 29,96	42,66 \pm 43,39	0.0 \pm 0,0
TMP2	20,27 \pm 14,26	16,67 \pm 19,24	0.0 \pm 0,0
TMC	29,41 \pm 19,89	34,71 \pm 27,58	0.0 \pm 0,0
TMH1	22,43 \pm 6,31	0,0 \pm 0,0	0.0 \pm 0,0
TMH2	21,80 \pm 6,11	0,0 \pm 0,0	0.0 \pm 0,0
TMH3	28,81 \pm 9,91	0,0 \pm 0,0	0.0 \pm 0,0
TMA1	26,53	0,0	0.0
TMA2	12,68	0,0	0.0
TMA3	28,13	0,0	0.0

A avaliação da qualidade dos embriões somáticos regenerados em meio de maturação (normais e anómalos) foi feita através da observação do seu aspecto e da sua cor, após os tratamentos. Embriões translúcidos foram considerados embriões de baixa qualidade, com uma probabilidade de germinação mais reduzida, enquanto embriões mais opacos e brancos foram considerados embriões de boa qualidade, com uma probabilidade superior de regenerarem plantas, segundo a escala descrita na secção 2.2.4.

Segundo a classificação efectuada, foi para a linha TV-CE1, que se observou os embriões somáticos de melhor qualidade, nos tratamentos TMC, com carvão activado, e

3. Resultados

TMP2, com a combinação dos osmóticos sacarose (40 g/l) e PEG 4000 (25 g/l). O tratamento TMH2, com 100 μ M de H₂O₂, foi o que apresentou embriões mais translúcidos e portanto com menor qualidade (Tabela 6).

Relativamente ao calo embriogénico TV-CE2, nos tratamentos em que houve formação de embriões somáticos, estes foram frequentemente de qualidade inferior aos embriões obtidos a partir do calo TV-CE1, sendo os tratamentos TM2 e TMC aqueles nos quais se verificou a formação dos embriões de melhor qualidade (Tabela 6).

Tabela 6- Avaliação da qualidade dos embriões somáticos formados em cada meio de maturação, consoante a linha embriogénica utilizada como explante. O sinal negativo é utilizado para tratamentos onde não se desenvolveram este tipo de estruturas e o sinal positivo para indicar a formação de embriões somáticos. Tratamentos assinalados com o sinal + são os que apresentam embriões somáticos de qualidade mais reduzida e com +++ são os que apresentam embriões com melhor qualidade.

Meio de maturação	TV-CE1	TV-CE2	TJ-CE3
TM1	++	++	-
TM2	+++	+++	-
TMC	++++	+++	-
TMP1	+++	+	-
TMP2	++++	-	-
TMA1	+++	-	-
TMA2	++	-	-
TMA3	+++	-	-
TMH1	++	-	-
TMH2	+	-	-
TMH3	+++	-	-

De um modo geral, constatou-se que nos ensaios com vista à obtenção de embriões somáticos maduros sem anomalias morfológicas, as respostas divergiram bastante, especialmente entre os vários tipos de calo utilizados. As secções seguintes referem-se aos resultados observados nos diferentes tratamentos agrupados segundo a função dos compostos adicionados ao meio.

3.3.1- Agentes osmóticos

A função e a importância de compostos indutores de stress no processo de embriogénese somática é bem conhecida e relatada por vários autores. Na fase de maturação dos embriões somáticos a sua presença parece ser um factor decisivo e como tal

3. Resultados

escolheram-se dois agentes com funções promotoras de stress osmótico, a sacarose e o PEG 4000 para tentar otimizar esta fase.

Nestes ensaios foi possível comprovar a importância da sacarose na maturação, não só através do aumento do número de embriões com o aumento da concentração de sacarose no meio de cultura, mas também da sua qualidade (Fig. 17), para ambos os calos embriogénicos.

Já os tratamentos com PEG 4000 não se revelaram, no geral, tão eficazes como aqueles em que foi aplicada apenas sacarose. No entanto, quando se compara a aplicação de 25 g/l de sacarose ao meio (TM1) com a aplicação da mesma concentração de sacarose em combinação com 25 g/l de PEG 4000 (TMP1), verificou-se uma maior formação de embriões normais no segundo tratamento.

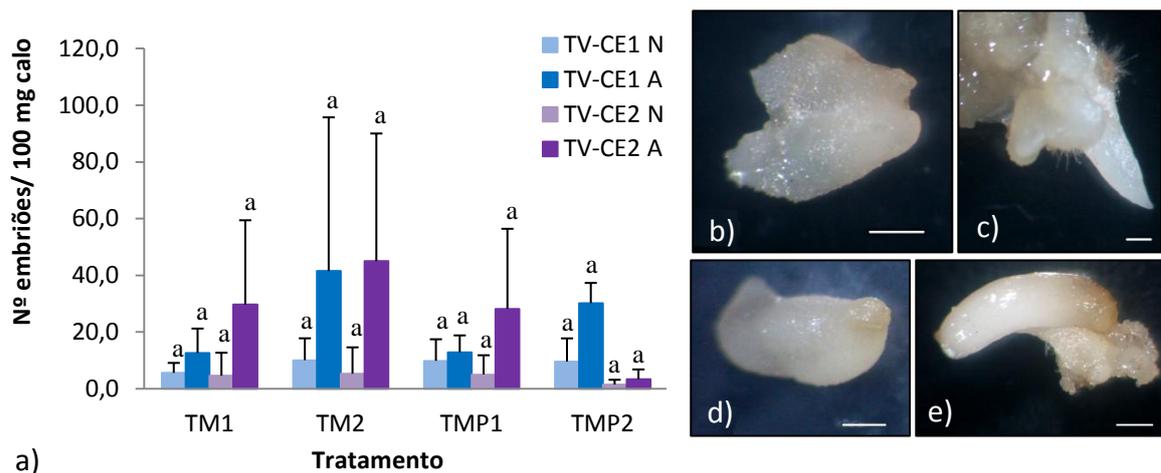


Figura 17- Efeito dos agentes osmóticos sacarose e PEG 4000 na maturação de embriões somáticos de TV-CE1 e TV-CE2. **a)** Número de embriões somáticos normais (N) e anormais (A) formados por cada 100 mg de calo TV-CE1 e TV-CE2 em cultura, para os tratamentos TM1 (25 g/l sacarose), TM2 (40 g/l sacarose), TMP1 (25 g/l sacarose + 25 g/l PEG 4000) e TMP2 (40 g/l sacarose + 25 g/l PEG 4000). Letras semelhantes significam que não existem diferenças significativas entre o número de embriões registado em cada tratamento, segundo o teste de Fisher ($p < 0,05$). **b – e)** Embriões somáticos derivados do calo TV-CE1 em meio TM1 (**b**), TM2 (**c**), TMP1 (**d**) e em TMP2 (**e**). As barras correspondem a 1 mm.

A avaliar pelos dados representados na figura 17, o tratamento que permitiu a formação de um maior número de embriões somáticos, normais e anormais, foi o tratamento TM2. No entanto, se o parâmetro for a quantidade de embriões normais formados, o tratamento mais eficiente, foi o TM2, no caso do calo TV-CE1, e o tratamento TMP1, no caso do calo TV-CE2.

3. Resultados

3.3.2- Carvão activado

O carvão activado é uma substância cujo papel na embriogénese somática ainda não está bem definido, no entanto, devido às suas propriedades de adsorvente, tem sido utilizado em vários ensaios, tanto na maturação como na germinação de plântulas.

A adição de carvão activado mostrou-se mais eficaz para o calo TV-CE1 permitindo a formação de mais embriões normais por massa de calo em cultura (Fig. 18a). Para ambas as linhas embriogénicas em estudo, pôde constatar-se que, apesar de não haver diferenças significativas na quantidade de embriões formados nos tratamentos TM2 e TMC, a presença de carvão activado no meio TMC permitiu o desenvolvimento de embriões somáticos de melhor qualidade (Figs. 18b e 18c), com tonalidade mais opaca e menor número de anomalias.

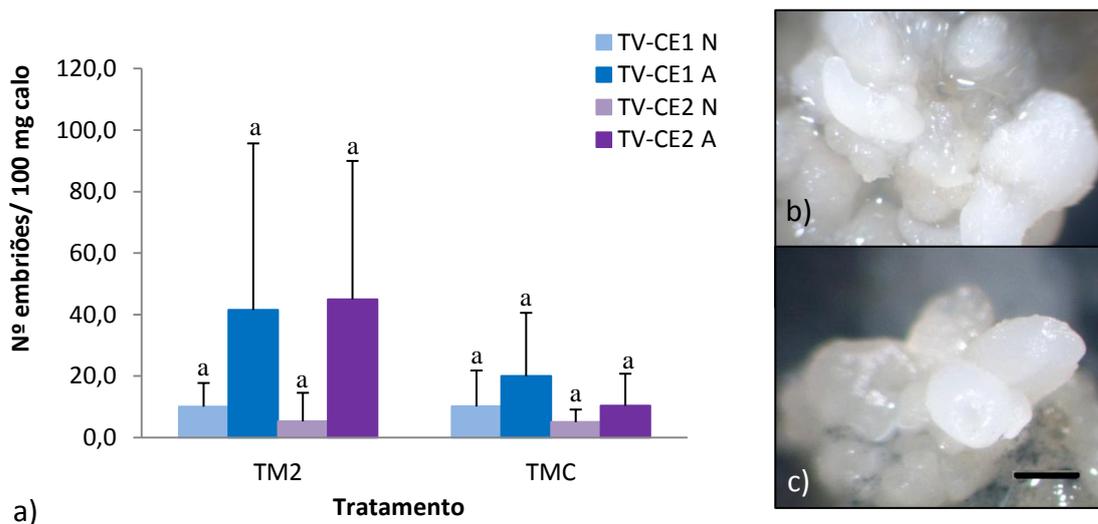


Figura 18- Efeito da adição de carvão activado na maturação de embriões somáticos de TV-CE1 e TV-CE2. **a)** Número de embriões somáticos normais (N) e anómalos (A) formados por cada 100 mg de calo TV-CE1 e TV-CE2 em cultura, para os tratamentos TM2 (sem carvão activado) e TMC (10 mg/l carvão activado). Letras semelhantes significam que não existem diferenças significativas entre o número de embriões registado em cada tratamento, segundo o teste de Fisher ($p < 0,05$). **b - c)** Embriões somáticos formados em meio TMC a partir do calo TV-CE1 (**b**) e TV-CE2 (**c**). As barras correspondem a 1 mm.

3.3.3- Ácido abscísico

O ABA foi o único regulador do crescimento vegetal utilizado nestes ensaios de maturação.

3. Resultados

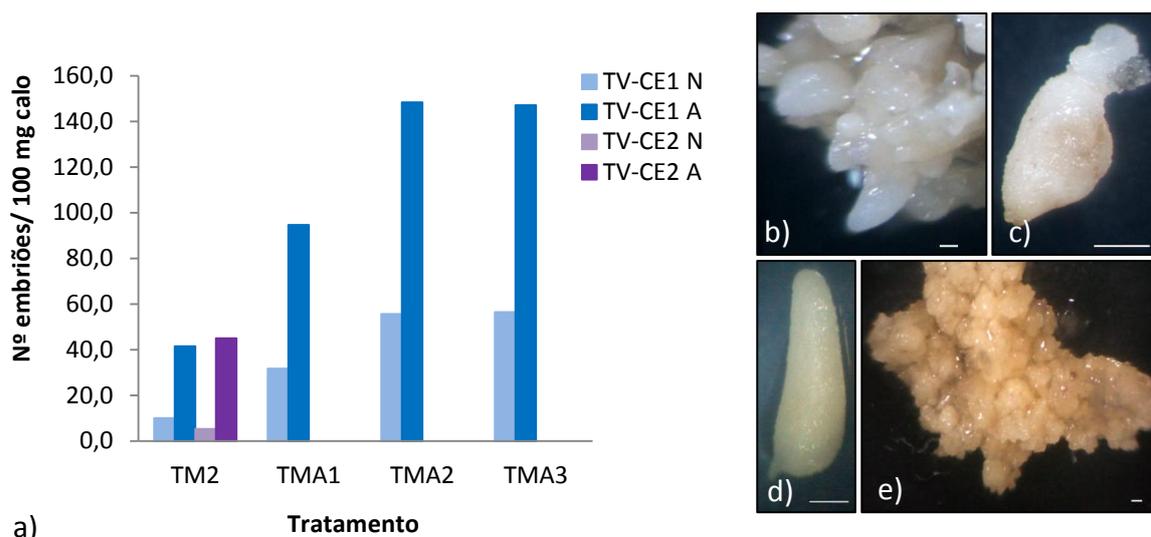


Figura 19- Efeito da adição de ABA na maturação de embriões somáticos de TV-CE1 e TV-CE2. **a)** Número de embriões somáticos normais (N) e anómalos (A) formados por cada 100 mg de calo TV-CE1 e TV-CE2 em cultura, para os tratamentos TM2 (sem ABA), TMA1 (1 mg/l ABA), TMA2 (2 mg/l ABA) e TMA3 (4 mg/l ABA). **b - d)** Embriões somáticos formados em meio TMA1 (**b**), TMA2 (**c**) e TMA3 (**d**) a partir do calo TV-CE1. **e)** Calo TV-CE2, sem desenvolvimento de embriões somáticos, após o período de maturação. As barras correspondem a 1 mm.

Com a realização destes ensaios foi possível observar o aumento do número de embriões formados por massa de calo embriogénico em função do aumento da concentração de ABA no meio de maturação para a linha embriogénica TV-CE1 (Fig. 19a). Para este calo embriogénico, o tratamento com 4 mg/L de ABA (TMA3), correspondente à concentração máxima utilizada deste composto, foi aquele em que se verificou o maior número de embriões somáticos formados por massa de calo e também aquele em que se observou o maior número de embriões normais.

Em todos os tratamentos com ABA o calo TV-CE2 manteve sempre o seu aspecto embriogénico, não se verificando a formação de embriões somáticos independentemente da concentração de ABA aplicada, após as 4 semanas em meio de maturação (Fig. 19d).

3.3.4- Agentes oxidativos

Para além do stress osmótico, o stress oxidativo, induzido pela adição de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) ao meio de maturação, tem também sido descrito como uma estratégia para promoção do desenvolvimento normal de embriões somáticos.

3. Resultados

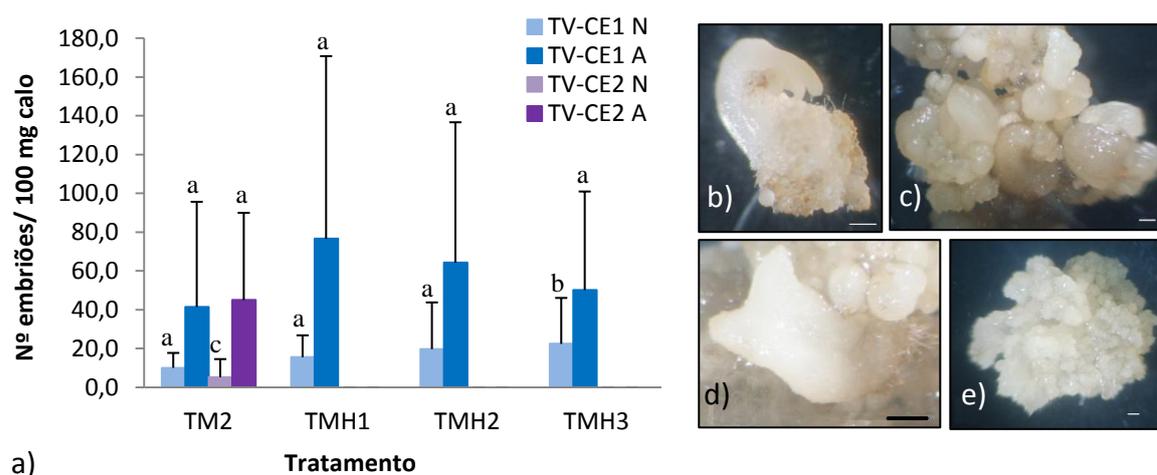


Figura 20-Efeito do H_2O_2 na maturação de embriões somáticos de TV-CE1 e TV-CE2. **a)** Número de embriões somáticos normais (N) e anómalos (A) formados por cada 100 mg de calo TV-CE1 e TV-CE2 em cultura, para os tratamentos TM2 (sem H_2O_2), TMH1 ($50 \mu M H_2O_2$), TMH2 ($100 \mu M H_2O_2$) e TMH3 ($200 \mu M H_2O_2$). Letras diferentes significam que existem diferenças significativas entre o número de embriões registado em cada tratamento, segundo o teste de Fisher ($p < 0,05$). **b – d)** Embriões somáticos formados a partir do calo TV-CE1 nos meios TMH1 (**b**), TMH2 (**c**) e TMH3 (**d**). Em **e)** é possível ver a resposta do calo TV-CE2, sem formação de embriões somáticos, semelhante em todos os tratamentos TMH. As barras correspondem a 1 mm.

A aplicação de baixas concentrações de H_2O_2 nos meios de maturação permitiu a obtenção de mais embriões por massa de calo embriogénico, comparativamente ao controlo (meio TM2, sem H_2O_2). Particularmente no que diz respeito ao número de embriões normais contabilizados, observou-se o seu aumento em função do aumento da concentração de H_2O_2 no meio (Fig. 20a). À semelhança do que se verificou com os tratamentos em que se recorreu à aplicação de ABA, não foi conseguida a maturação de embriões provenientes de calo TV-CE2 com a aplicação de H_2O_2 .

3.4- Maturação de embriões somáticos a partir de culturas de tecido embriogénico obtido em suspensões celulares

Neste ensaio foram testados dois meios de maturação sem agentes gelificantes, o TM2-1 (40 mg/l sacarose, sem carvão activado, líquido) e o TMC-1 (40 mg/l sacarose, sem carvão activado, líquido), para os quais foram transferidas massas de células embriogénicas crescidas em suspensões celulares. No caso das células transferidas para meio de maturação TM2-1, verificou-se a sua proliferação (dados não apresentados), no entanto não ocorreu o desenvolvimento de embriões somáticos, após as 4 semanas de

3. Resultados

cultura. Relativamente às células transferidas para meio TMC-1 a resposta obtida traduziu-se na formação de embriões somáticos por massa de calo embriogénico em número superior ao controlo em meio solidificado (TMC-s), tanto no que diz respeito aos embriões normais como aos anómalos, mas apenas para a linha TV-CE1 (Fig. 24a).

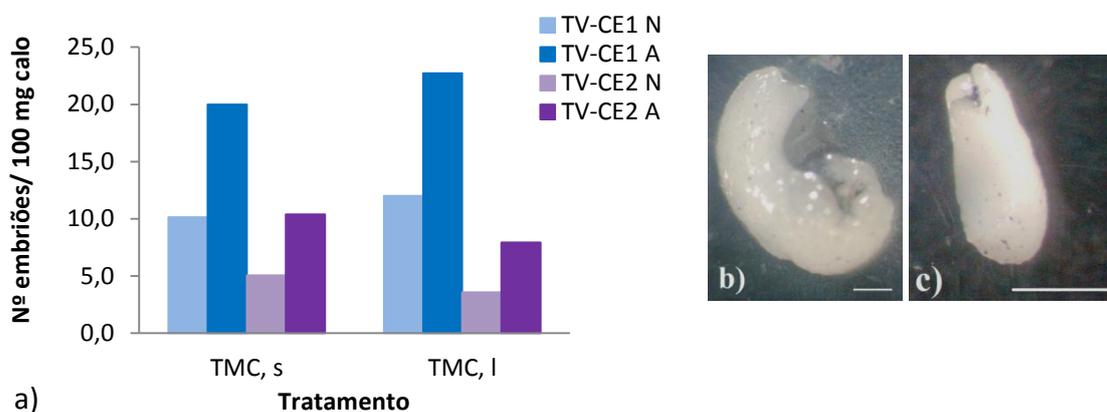


Figura 21- Efeito da cultura em meio líquido na maturação de embriões somáticos de TV-CE1 e TV-CE2. **a)** Número de embriões somáticos normais (N) e anómalos (A) formados por cada 100 mg de calo TV-CE1 e TV-CE2 em cultura, para os tratamentos TMC, s (solidificado) e TMC, l (líquido). **b - c)** Embriões somáticos derivados do calo TV-CE1 (**b**) e TV-CE2 (**c**), em meio TMC,l. As barras correspondem a 2mm (a) e 1 mm (b).

Tabela 7- Avaliação da qualidade dos embriões somáticos formados em cada um dos meios de maturação líquidos, consoante a linha embriogénica utilizada como explante. O sinal negativo é utilizado para indicar a ausência da formação de embriões, o sinal ++++ indica a formação de embriões de qualidade muito boa.

Meio de maturação	TV-CE1	TV-CE2	TJ-CE3
TM2, l	-	-	-
TMC, l	++++	++++	-

A qualidade dos embriões formados em suspensão TMC é bastante elevada, como se pode observar nas figuras 21 b) e c) e como foi esquematizado na tabela 7. Os embriões somáticos formados eram na sua grande maioria branco opacos, demonstrando assim a acumulação de substâncias de reserva.

Avaliando a qualidade dos embriões formados, tanto em suspensões como em meios solidificados, os embriões TV-CE2 de melhor qualidade foram observados com recurso às suspensões TMC-1, e os embriões TV-CE1 formados também apresentavam um elevado grau de opacidade e uma cor branca consistente.

3.5- Germinação dos embriões somáticos formados

Após contabilização, os embriões somáticos formados em meio de maturação, foram transferidos para meio de germinação, para se desenvolverem em plântulas. Apesar do elevado número de embriões normais e de boa qualidade formados nos ensaios de maturação, a sua germinação, na grande maioria dos casos, não foi bem sucedida. A figura 22 representa as respostas mais frequentes observadas durante o período de germinação. Muitos dos embriões não se desenvolveram, mantendo o aspecto que tinham quando foram transferidos para as condições de germinação. Alguns dos embriões começaram por se desenvolver, sofrendo alongamento e crescimento dos cotilédones, contudo, verificou-se a formação de calo na base destes embriões (Figs. 22a - c), que após três semanas acabaram por se desdiferenciar totalmente, (Figs. 22d e 22e) ou oxidar (Fig. 22 f).

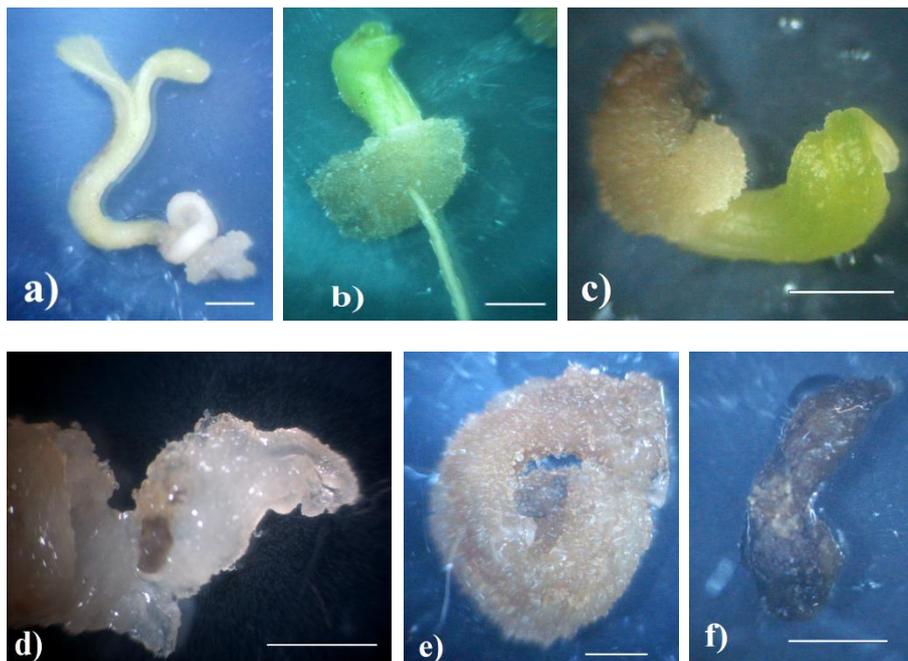


Figura 22- Representação da resposta dos embriões em meio de germinação. De a-c é possível observar os embriões a continuarem o seu desenvolvimento e de d-f embriões desdiferenciados ou oxidados. As barras correspondem a 5 mm.

3.6- Análises morfológicas e histológicas

Através da análise à lupa e ao microscópio óptico, foi possível distinguir e caracterizar diferentes tipos de tecidos que se formaram no processo de embriogênese somática. As estruturas em estudo foram massas pro-embriogénicas, calo embriogénico em

3. Resultados

meio de indução e em meio de desenvolvimento e embriões somáticos, representados na figura 23.

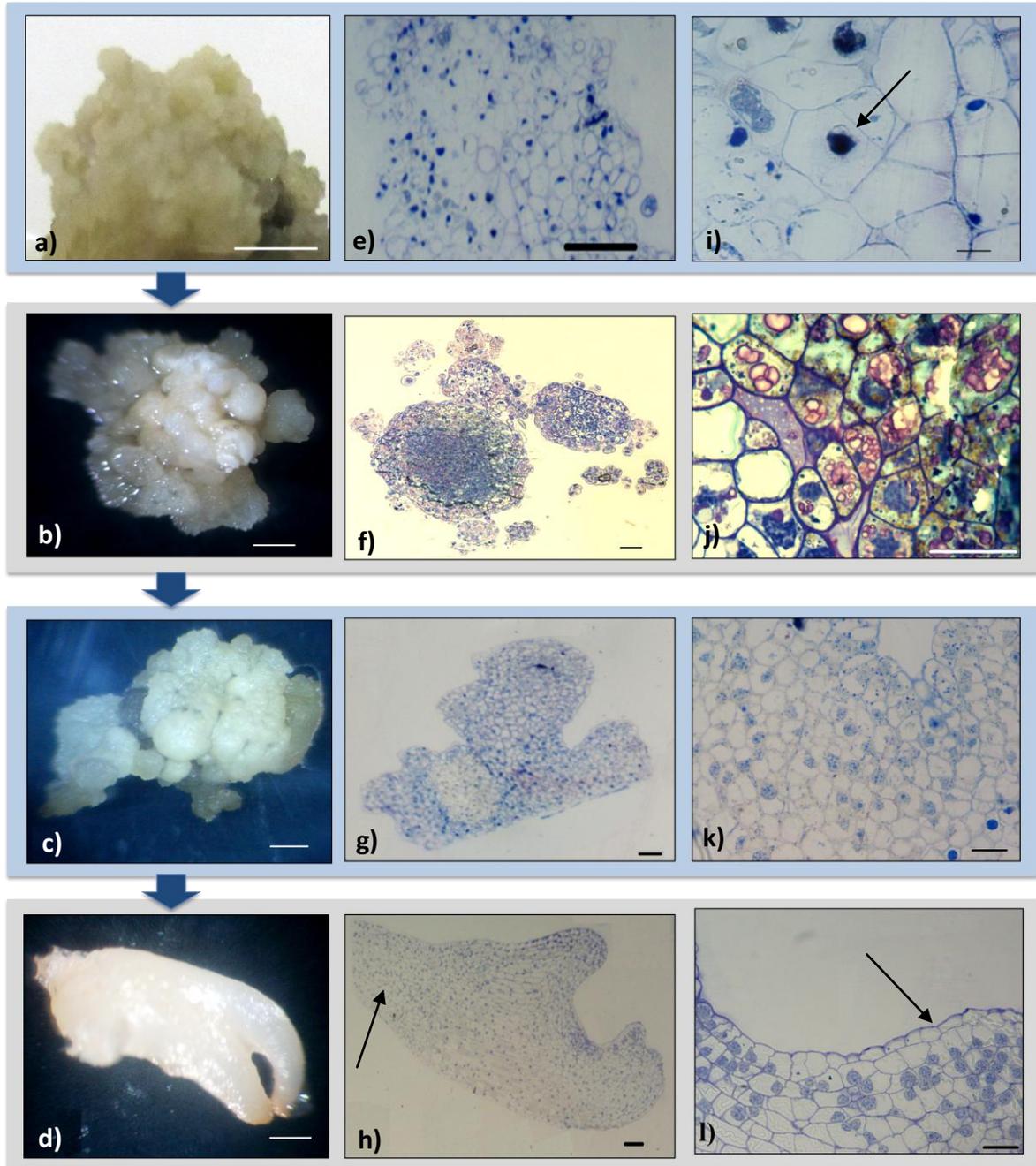


Figura 23- Modificações nas estruturas embrionárias durante a transição de calo embriogênico para embriões. a – d) Evolução das massas pro-embriogênicas (a) induzidas no meio TI1, em calo embriogênico proliferado no mesmo meio (b), e após transferência para meio de maturação (c) até à formação de um embrião somático maduro (d), formado no meio de maturação TMP2. e – l) Secções dos diferentes explantes coradas com azul de toluidina. Notar a grande vacuolização das células em i e a acumulação de amido em k. As células dos embriões (l) apresentam também uma acentuada vacuolização e reduzida acumulação de reservas. As barras de a) a d) correspondem a 2 mm, de e) a h) a 100 µm e de i) a l) a 50 µm.

3. Resultados

As massas pro-embriogénicas são caracterizadas por uma actividade mitótica elevada. As suas células são extremamente vacuolizadas, sendo compostas por poucas substâncias de reserva, como se pode comprovar pelas figuras 23 e) e i). Na figura 23 i) a seta indica uma célula que se dividiu recentemente, com uma parede celular menos espessa, por ser mais recente. As divisões sucessivas são uma característica deste tipo de tecidos, resultando numa proliferação destas massas.

O calo embriogénico é formado por aglomerados celulares (massas pro-embriogénicas) onde também se podem encontrar estruturas análogas a embriões no estado globular, embora muitas vezes sem uma protoderme muito definida (Fig 23 b). As células destas estruturas apresentam uma grande quantidade de grãos de amido e vacúolos como se pode observar na figura 23 j. Este tipo de calo também ele é caracterizado por uma elevada taxa de proliferação onde figuras mitóticas são frequentes.

Para o meio de germinação, juntamente com os embriões, são transferidas pequenas porções de calo embriogénico que não se conseguem isolar totalmente dos embriões. Estes calos continuam a proliferar e as massas proembriogénicas que se formam evoluem para as fases iniciais do desenvolvimento embrionário. As células destes calos têm um teor reduzido de substâncias de reserva, em particular de amido (Figs. 23 g, k). Divisões celulares eram também comuns nestes tipo de material. A figura 23k) mostra um detalhe das células deste tipo de calo sendo notório o elevado volume nuclear.

Na figura 23 d) pode observar-se um embrião obtido a partir de um dos tratamentos de maturação (TMP2), em estado cotiledonar. Secções destes embriões Fig. 23 h, mostram uma protoderme bem definida, os dois cotilédones e uma zona apical de células mais coradas, provavelmente correspondentes ao meristema apical do caule em desenvolvimento, evidenciada por uma seta. Na figura 23l correspondente a uma secção do cotilédone, pode observar-se a protoderme (indicada pela seta) e a forte vacuolização destas células.

3. Resultados

Os diferentes tipos calos embriogénicos e embriões somáticos foram também analisados por microscopia electrónica de varrimento. Os resultados comprovaram algumas das observações já efectuadas. Assim, a figura 24 mostra as massas proembriogénicas onde é notório o seu aspecto pouco organizado (Fig. 24a) e a presença de algumas células muito alongadas (Fig. 24b) que contrastam com as restantes células que apresentam dimensões mais reduzidas e uma forma mais ou menos isodiamétrica.

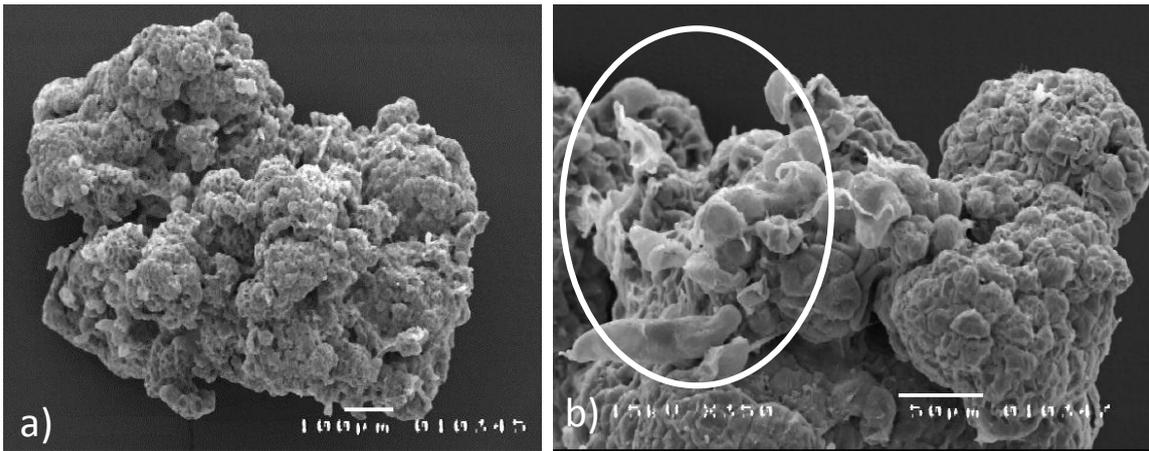


Figura 24- Massas pro-embriogénicas observadas no microscópio electrónico de varrimento. Em a) uma vista geral e em b) um pormenor destas estruturas.

As massas pro-embriogénicas, representadas na figura 24, apresentaram-se pouco organizadas, agrupadas de forma pouco padronizada. Em a) pode-se observar uma massa pro-embriogénica característica, amorfa, sem zonas bem definidas. Em b) estão assinaladas células maiores, típicas dos calos não embriogénicos.

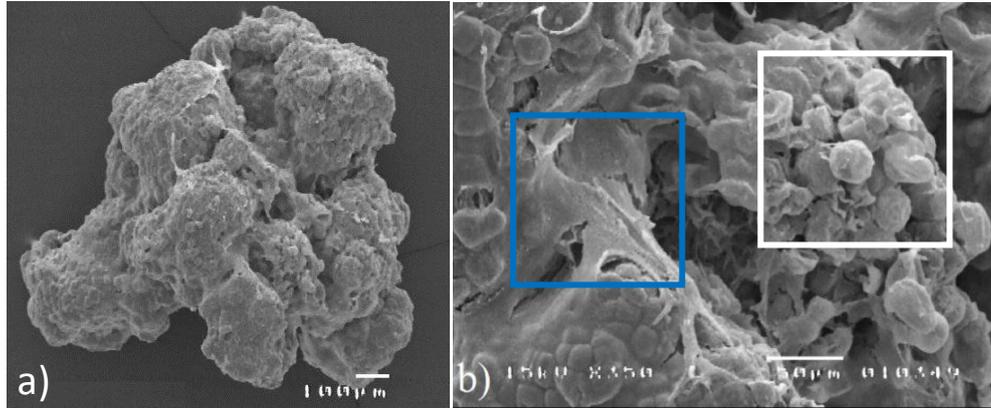


Figura 25- Calo embriogénico formado em meio T12, observado no microscópio electrónico de varrimento. Em a) o aspecto geral deste tipo de tecido e, em b), uma ampliação onde é notória a presença de células isodiamétricas (quadrado branco) e da película que cobre a superfície dos calos (quadrado azul).

Os calos embriogénicos, por sua vez, mostraram a sua organização típica em agregados celulares (Fig. 25a). Estes calos são também formados por células isodiamétricas e apresentam-se em grande parte cobertos por uma película de natureza desconhecida (Fig. 25b).

3. Resultados

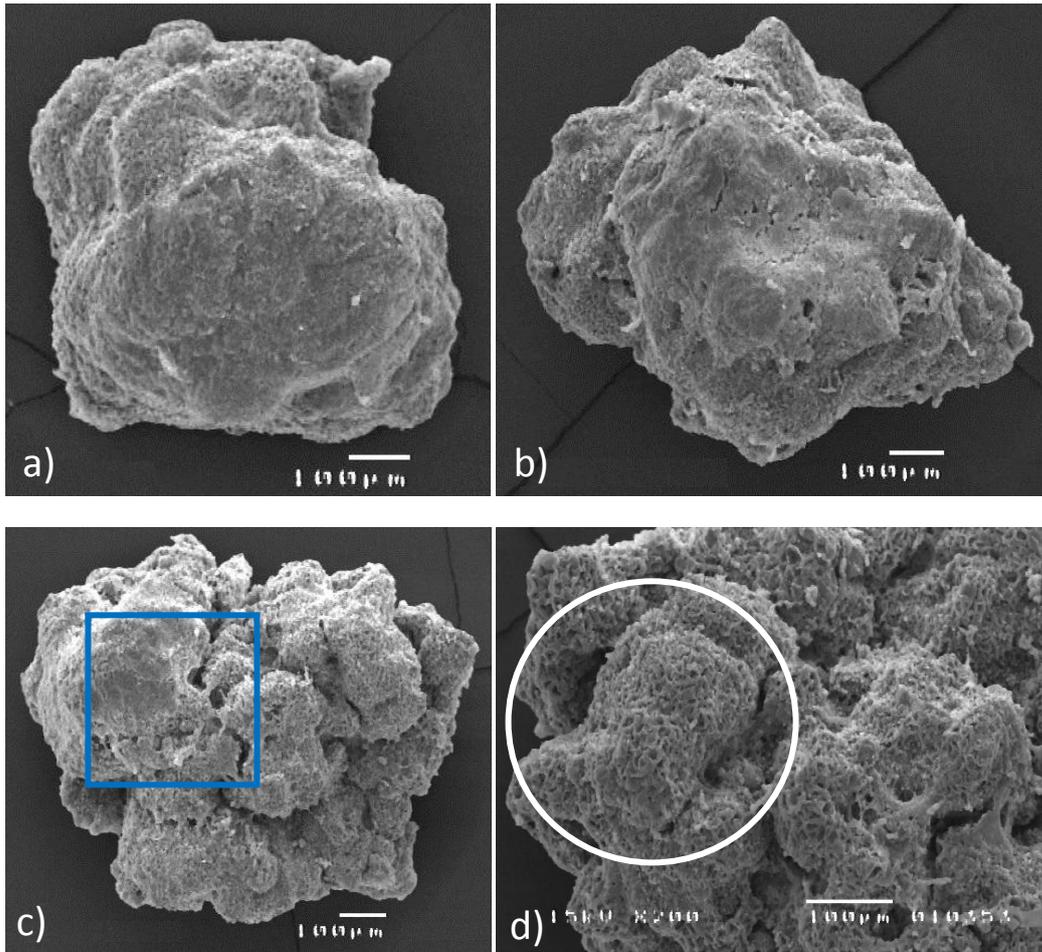


Figura 26- Calo embriogénico em meio de germinação observado no microscópio electrónico de varrimento. De a) a c) pode-se observar uma vista geral destas estruturas e em d) uma ampliação. Película envolvente (no quadrado azul) e agregado embriogénico (no círculo branco).

A proliferação dos calos embriogénicos em meio de germinação (Fig. 26) mostra o aspecto nodoso do tecido. A película envolvente, referida nos calos descritos anteriormente estava também presente (Fig. 26c). Cada um dos agregados (Fig. 26d) corresponde a um potencial embrião, que pode evoluir para um embrião somático nas condições apropriadas ou continuar a proliferar, produzindo novas massas de células.

3. Resultados

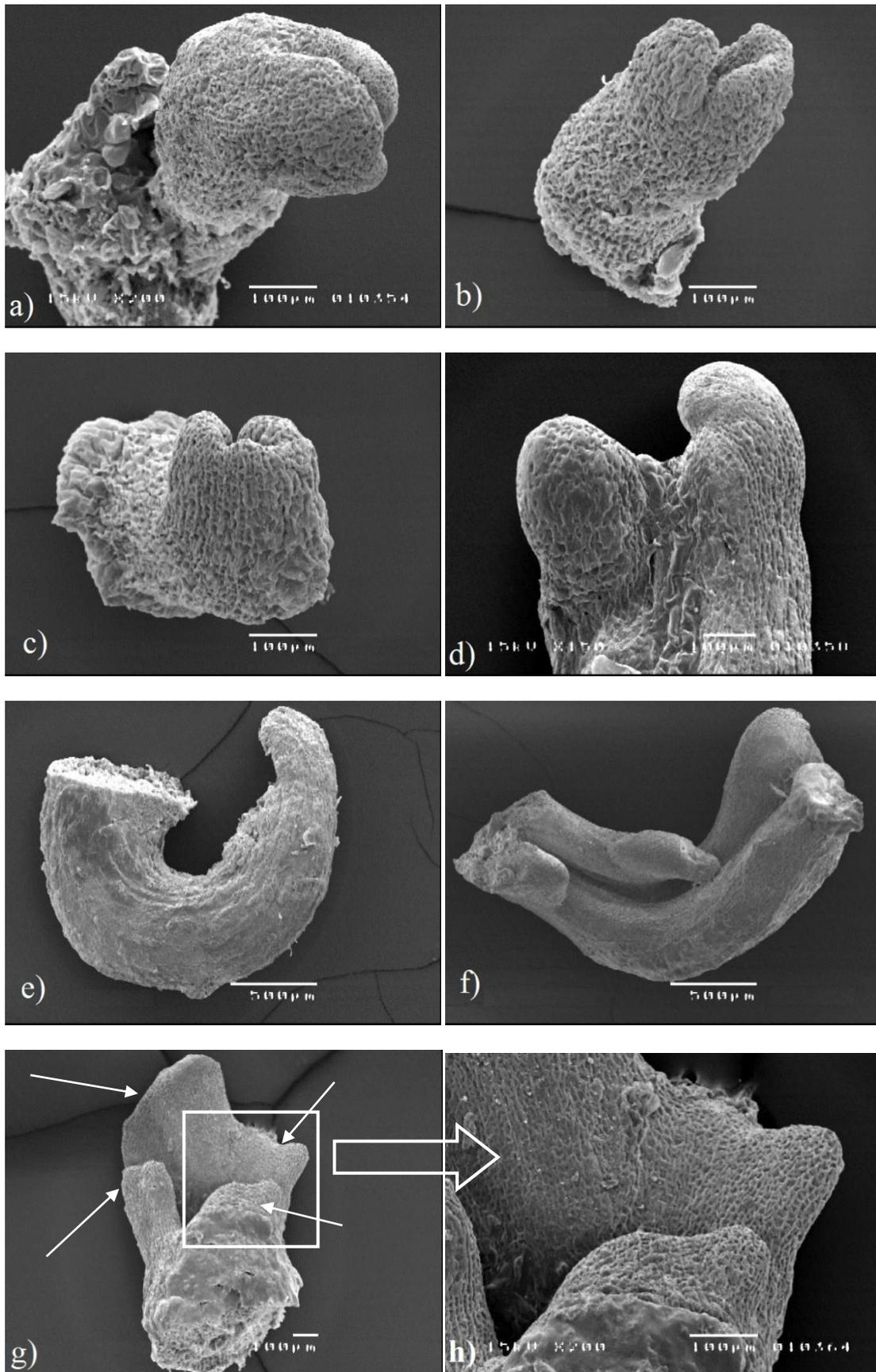


Figura 27- Embriões somáticos formados em meio TMS2 observados no microscópio electrónico de varrimento. Embriões normais em a) e b) e diferentes tipos de anomalias c-h. A figura H é uma ampliação da zona salientada na figura g.

3. Resultados

Os embriões somáticos formados no meio de maturação, podem apresentar uma morfologia normal, com cotilédones bem definidos e uma zona radicular relativamente desenvolvida, como se pode observar nas figuras 27 a) e b), ou apresentar anomalias morfológicas (Figs. 27 c) e h). As anomalias dos embriões apresentam morfologias muito distintas que podem ir desde cotilédones em forma de taça (Fig. 27c), a um número de cotilédones superior ao normal (Fig. 27d), à não diferenciação de cotilédones (Fig. 27e) ou a embriões fundidos (Figs. 27 f, g e h),

3.7- Níveis endógenos de peróxido de hidrogénio

As concentrações de peróxido de hidrogénio endógenos, medidas como foi descrito na secção 2.2.6, revelaram diferenças entre várias linhas de calo testados, com capacidades embriogénicas distintas e diferentes tempos desde a sua indução, como se pode verificar na figura 28. Os dados mostram que o calo TV-CE2 apresenta um teor em peóxido de hidrogénio bastante mais elevado que os restantes tipos de calos.

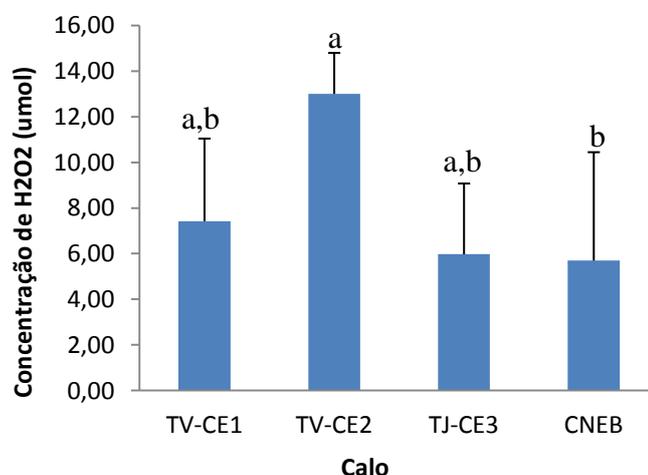


Figura 28- Variação da concentração endógena de peróxido de hidrogénio em diferentes linhas de calo embriogénico (TV-CE1, TV-CE2 e TJ-CE3) e não embriogénico (CNEB). Letras diferentes traduzem diferenças significativas segundo o teste de Fisher ($p < 0,05$).

Na figura 28 podemos observar que as linhas de calo embriogénico TV-CE1 e TV-CE2, especialmente este último, apresentam concentrações mais elevadas de H₂O₂ endógeno, face aos calo embriogénico TJ-CE3 e ao calo não embriogénico utilizado como controlo (CNEB).

4. Discussão



4.1- Indução de organogénese

Nos trabalhos de indução de organogénese realizados, a resposta geral observada, incluindo a formação de calo nos explantes, está de acordo com os resultados obtidos em trabalhos anteriores, na mesma espécie e no mesmo cultivar, realizados no Laboratório de Biotecnologia da FCTUC (Santos, 2012).

A formação de calo durante o processo de indução de organogénese foi também reportada noutras Solanáceas, mais especificamente em *Solanum tuberosum* (Anjum e Ali, 2004) e *Solanum melongena* (Magioli *et al.*, 1998; Xing *et al.*, 2010) mas também noutras espécies de outras famílias, como em *Morus* spp. (Chitra e Padmaja, 2005) e em *Opuntia ficus-indica* (Angulo-Bejarano e Paredes-López, 2011). No entanto, têm sido desenvolvidos trabalhos no sentido de obter protocolos mais directos, sem a fase de formação de calo (Chitra e Padmaja, 2005), através da manipulação hormonal ou doutros compostos do meio como a sacarose (Xing *et al.*, 2010).

Em beringela (*S. melongena*), os cotilédones e segmentos foliares foram indicados como sendo os explantes com uma maior capacidade de resposta em ensaios de organogénese (Magioli *et al.*, 1998; Xing *et al.*, 2010). Nos ensaios realizados por Santos (2012) com tamarilho, os segmentos foliares também revelaram uma elevada capacidade para regenerar plântulas por esta técnica.

No presente trabalho as respostas organogénicas obtidas foram menos evidentes que as obtidas por Santos (2012). No entanto, entre os dois trabalhos diferem o genótipo de ambos os cultivares de TV e a origem dos explantes, sendo o material vegetal utilizado por Santos (2012) de origem seminal e o presente estabelecido a partir de uma árvore adulta. Tendo em conta este facto, é possível interpretar a diferente resposta obtida na indução de organogénese, visto que, já em batata, o genótipo, a origem do explante, os reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura e as condições de incubação foram indicadas como sendo factores determinantes neste processo (Anjum e Ali, 2004). Além disso, os meios de cultura seleccionados, com base nos que demonstraram melhores respostas no trabalho realizado por Santos (2012), podem não ser os mais indicados para os explantes derivados de material adulto, mais recalcitrante que o obtido por via seminal, implicando assim uma optimização dessa condição.

4.2- Indução de embriogénese somática

No trabalho realizado testaram-se 3 genótipos distintos (TA, TV e TL), confirmando-se que, à semelhança do que se verificou em trabalhos anteriores (Guimarães *et al.*, 1996; Lopes *et al.*, 2000; Canhoto *et al.*, 2005; Correia *et al.*, 2009; Correia e Canhoto, 2012), a indução de embriogénese somática é um sistema em duas fases. Uma primeira fase onde se verifica a formação de calo embriogénico em meio de indução, neste caso meio base MS com 90 g/l de sacarose e a presença de uma auxina, e uma segunda fase, onde os embriões se desenvolvem a partir de massas embriogénicas, num meio diferente do anterior, meio base MS com 40 g/l de sacarose na ausência de reguladores de crescimento (Correia *et al.*, 2012; Correia e Canhoto, 2012).

Na fase de indução formam-se 2 tipos distintos de calo, um deles, designado embriogénico, de aspecto mais esbranquiçado, formado por aglomerados de massas mais ou menos esféricas, com uma consistência rígida e crescimento lento (Guimarães *et al.*, 1988), o outro mais amarelado, cresce mais rapidamente e tem uma consistência mais friável e é conhecido como calo não embriogénico devido à sua incapacidade de formar embriões somáticos.

O tipo de explantes de tamarilho com potencial para iniciarem uma cultura embriogénica inclui embriões zigóticos maduros, folhas jovens, cotilédones e hipocótilos (Correia e Canhoto, 2012). No trabalho de Correia *et al.* (2011), para além do potencial de embriões zigóticos e segmentos foliares jovens de plantas micropropagadas, foram também testados outros explantes, nomeadamente segmentos de medula e tecidos florais de uma planta adulta, que não demonstraram capacidade de diferenciação de linhas embriogénicas. A recorrência a embriões zigóticos maduros e a segmentos foliares já tinha sido observada noutros trabalhos e o seu sucesso na obtenção de tecido embriogénico e posteriormente na regeneração de plântulas comprovado (Guimarães *et al.*, 1988; Lopes *et al.*, 2000), pelo que nos ensaios de indução de embriogénese somática realizados ao longo deste trabalho se optou por utilizar segmentos foliares jovens como explante.

O genótipo foi indicado por Gaj (2004) como sendo um dos factores determinantes para o sucesso dos protocolos de indução de embriogénese somática em conjunto com outros parâmetros como a origem e estado de desenvolvimento do explante. Neste ensaio utilizaram-se explantes da mesma idade e mantidos nas mesmas condições, sendo deste modo o genótipo a variável a ser avaliada. O genótipo de tamarilho vermelho foi aquele

onde se obteve a melhor resposta nas condições testadas, já o de tamarilho laranja demonstrou ser aquele onde se formou uma menor quantidade de massas embriogénicas. A aquisição de potencial embriogénico em culturas em meio de indução é acompanhada por alterações na expressão genética (de Vries *et al.*, 1988), o que leva a diferentes respostas consoante os vários génotipos, uma vez que essas alterações na expressão genética podem ser mais ou menos acentuadas em função do génotipo em questão.

No segundo ensaio de indução de embriogénese somática realizado foram testadas duas auxinas diferentes (picloram e 2,4-D), face a duas concentrações de sacarose (90 e 30 g/L), recorrendo a explantes de menores dimensões que os usados habitualmente. Uma das observações mais evidentes face aos resultados obtidos é que a sacarose parece ter um papel mais importante na reprogramação das células somáticas e na iniciação de um programa embriogénico que o tipo de auxina em questão, uma vez que quando se utilizou 90 g/l de sacarose ocorreu a formação de calo embriogénico, independentemente da auxina utilizada e quando a quantidade de sacarose foi reduzida para 30 g/l a formação desse tecido não ocorreu, quer se utilizasse picloram ou 2,4-D no meio de indução. Lopes *et al.* (2000) tinham já verificado que concentrações elevadas de sacarose (120 g/l) são mais eficientes no que diz respeito à eficiência da formação de tecido embriogénico, no entanto este tecido cresce melhor na presença de 90 g/l de sacarose no meio.

A importância da sacarose no processo de embriogénese somática deve-se em parte ao seu papel como fonte de energia mas também ao facto de esta substância criar condições osmóticas ideais para o crescimento celular *in vitro* (Gaj, 2004). A sacarose tem também uma função de agente de stresse osmótico, quando são empregues concentrações mais elevadas e como é conhecido os mecanismos de stresse têm um papel fundamental no processo de embriogénese somática, estando directamente envolvidos no mecanismo de reprogramação celular (Fehér *et al.*, 2003).

O papel das auxinas na fase de indução de embriogénese somática, como já foi anteriormente referido, está amplamente estudado e a sua importância comprovada. Em tamarilho, nesta fase inicial, já foi estudado o efeito de várias auxinas, em particular, de 2,4-D (Guimarães *et al.*, 1988; Guimarães *et al.*, 1996), de NAA (Guimarães *et al.*, 1996) e de picloram (Lopes *et al.*, 2000). Os resultados obtidos no trabalho realizado, estão, de forma geral, de acordo com aqueles observados em trabalhos anteriores. Em tamarilho, concentrações inferiores a 1 mg/l de 2,4-D já tinham sido consideradas baixas demais para

induzir calo embriogénico (Lopes *et al.*, 2000). García e Martínez (1995) concluíram através dos seus ensaios que em *Solanum tuberosum* que a concentração de 2,0 mg/l de 2,4-D era uma das mais eficientes no processo de indução de calo embriogénico. Correia *et al.* também utilizaram a mesma concentração de 2,4-D para induzir calo embriogénico e verificaram que este tipo de tecidos podia ser mantido neste meio sem perda de potencial embriogénico durante longos períodos de tempo (Correia *et al.*, 2009). Ensaio previamente realizados permitiram concluir que em meio base MS, as melhores taxas de indução (40%) eram obtidas com uma concentração de picloram de 5 mg/l (Lopes *et al.*, 2000). Assim, o meio base MS com 5,0 mg/l de picloram e 90 g/l de sacarose tem sido o mais frequentemente utilizado para induzir embriogénese somática e manter o calo embriogénico induzido em proliferação. Concentrações mais baixas de picloram (1 ou 2 mg/l) estão indicadas na bibliografia como sendo aptas a produzir calo embriogénico embora com taxas mais baixas, 15 e 27%, respectivamente (Canhoto *et al.*, 2005).

Outro aspecto em estudo nos ensaios de indução de embriogénese somática realizados foi o efeito da fragmentação dos explantes nas taxas de indução obtidas. Apesar de este tratamento não se traduzir num aumento das taxas de indução face ao controlo (explantes foliares segmentados em 4 secções), verificou-se um aumento da quantidade de calo formada em cada explante induzido (dados não apresentados). De facto, o efeito da indução de feridas nos explantes como um indutor de stresse tem sido referenciado por alguns autores (Kiyossue *et al.*, 1993) como sendo de elevada importância na indução de processos morfogénicos, particularmente de embriogénese somática. Este é portanto um procedimento que deverá ser estudado mais detalhadamente, de forma a otimizar a composição do meio em função do aumento da eficácia na obtenção de calo embriogénico a partir de explantes fragmentados em pequenas porções.

4.3- Maturação dos embriões somáticos

Apesar do processo de indução de embriogénese somática em duas etapas permitir o potencial desenvolvimento de um elevado número de embriões somáticos e consequentemente plantas, uma das limitações inerentes a este processo prende-se com o elevado número de embriões anómalos formados a partir das massas embriogénicas.

Trabalhos anteriores realizados com tamarilho indicam a deficiente acumulação de substâncias de reserva, particularmente de lípidos, como uma das potenciais causas para o elevado número de embriões somáticos de baixa qualidade e portanto menor potencial de germinarem em plantas viáveis (Correia *et al.*, 2012). Também para outras espécies a etapa de maturação dos embriões somáticos é um estágio crítico do processo de embriogênese somática (Gaj, 2004; Sghaier *et al.*, 2009), cujas tentativas de otimização passam sobretudo pela manipulação dos constituintes do meio de maturação e das condições de cultura utilizadas (Agarwal *et al.*, 2004; Perán-Quesada *et al.*, 2004; Rai *et al.*, 2009). Foi portanto com o objectivo de tentar obter embriões de melhor qualidade, a partir de diferentes linhas embriogénicas em cultura, que nos ensaios realizados se manipularam diferentes meios de maturação no que diz respeito aos agentes osmóticos e oxidativos presentes no meio e à adição de carvão activado e ABA.

4.3.1- Agentes osmóticos

Os hidratos de carbono são fundamentais para a síntese de compostos orgânicos (Nawrot-Chorabik, 2012) e criam condições osmóticas adequadas para o crescimento celular *in vitro* (Gaj, 2004), limitam a captação de água, o que resulta em stress hídrico e na promoção do desenvolvimento dos embriões em cultura (Deo *et al.*, 2010). Geralmente a sacarose é o hidrato de carbono de eleição, provavelmente por ser o mais comum no floema das plantas (Gutiérrez-Mora *et al.*, 2012).

O PEG, por ser uma molécula com elevado peso molecular (Heringer *et al.*, 2010), não atravessa a membrana celular (Linossier *et al.*, 1997), conduzindo a uma restrição da captação de água, a uma pressão de turgescência reduzida e a um potencial osmótico intracelular mais reduzido (Körbes e Droste, 2005; Troch *et al.*, 2009), o que condiciona a captação de água desencadeando um stresse hídrico de maior duração durante o desenvolvimento embrionário (Troch *et al.*, 2009). Uma dessecação mais lenta resulta na acumulação substancial de proteínas de reserva necessárias ao desenvolvimento de embriões imaturos, em comparação com desidratações mais rápidas (Deo *et al.*, 2010).

Nos ensaios realizados com os agentes osmóticos referidos, sacarose e PEG 4000, independentemente do calo embriogénico utilizado, o PEG não se mostrou tão eficaz na formação de embriões, em quantidade, como o controlo com 40 g/l de sacarose (meio

TM2). No entanto, os embriões formados foram dos que indicaram uma maior presença de substâncias de reserva na sua composição, demonstrada pelo seu aspecto bastante opaco e pela sua cor branca.

O efeito positivo da aplicação de PEG nos meios de maturação tem sido reportado para diferentes espécies de angiospérmicas, como o castanheiro-da-índia (*Aesculus hippocastanum*), para o qual a inclusão desta substância promoveu uma maior qualidade do caule das plantas regeneradas (Troch *et al.*, 2009), ou a árvore-da-borracha (*Hevea brasiliensis*) onde foi referenciado o efeito destes osmóticos na redução do fenómeno de embriogênese secundária e na melhoria da conversão das massas pró-embriogénicas em embriões torpedo (Linossier *et al.*, 1997), mas também para coníferas como o *Pinus densiflora*, para o qual uma pressão osmótica estável e a aplicação de PEG com peso molecular apropriado têm sido indicados como factores chave para a produção de embriões somáticos de boa qualidade (Shoji *et al.*, 2006).

A escolha do peso molecular do PEG revela-se um factor importante. Segundo Shoji *et al.* (2006), pesos moleculares demasiado baixos desta substância podem não causar o stress ideal ao tecido embriogénico para o levar a alterar a sua resposta morfológica e pesos moleculares muito elevados de PEG podem causar alterações ao calo, como a morte celular. Também a concentração do composto selecionado é de extrema importância nos resultados obtidos. Com a utilização de PEG 4000, na maturação de embriões de *Abies numidica*, verificou-se que o número de embriões maduros era superior quando se utilizavam 100 mg/l deste osmótico (Vooková e Kormuták, 2002) e em *Chamaecyparis obtusa*, foram produzidos mais embriões somáticos quando a concentração de PEG utilizada foi de 150 mg/l (Taniguchi *et al.*, 2004).

Tendo em conta esta informação, o número baixo de embriões formados em meios com a adição de PEG em comparação a meios constituídos apenas por sacarose, nos ensaios de maturação em tamarilho, poderá estar relacionado com a necessidade de optimização destes parâmetros, de forma a que se obtenha um número superior de embriões somáticos.

4.3.2- Carvão activado

O carvão activado é uma substância constituída por carbonos dispostos numa forma quase grafítica em partículas de pequeno tamanho. Trata-se de um material poroso e insípido, constituído por uma fina rede de poros, uma área de superfície e volume extraordinariamente grandes que lhe conferem uma capacidade única de adsorção (Thomas, 2008) de substâncias inibitórias no meio ou produtos tóxicos libertados pelos explantes (Chagas *et al.*, 2005).

Nos ensaios realizados, durante a transição do meio de indução (rico em auxinas) para o meio de maturação verificou-se um aumento da massa de calo embriogénico, muitas vezes acompanhado com uma diminuição do rendimento do processo de maturação dos embriões. O facto de continuarem a haver auxinas remanescentes do meio de indução pode estar relacionado com este tipo de resposta (Rai *et al.*, 2007). As auxinas inibem o desenvolvimento do calo em embriões e simultaneamente promovem a proliferação do tecido embriogénico (Jiménez, 2001; Deo *et al.*, 2010).

O carvão activado tem sido referido como um factor benéfico na diminuição de taxas germinação precoce de embriões somáticos, em espécies como a soja (*Glycine max*) e na retenção de auxinas no meio (Sauner e Droste, 2005), o que pode ser de extrema importância visto que a presença de auxinas, particularmente em quantidades mais elevadas, no tecido embriogénico, poder ser um dos maiores condicionadores para o desenvolvimento destas massas em embriões somáticos.

Tanto com o calo TV-CE1 como com o calo TV-CE2, a quantidade total de embriões formados foi superior quando se utilizou apenas sacarose no meio de maturação (TM2) em comparação com o meio com carvão activado (TMC). No entanto, apesar do número de embriões em meio TMC ter sido mais baixo, a sua qualidade foi muito superior à dos embriões gerados em meio TM2, sendo mesmo dos embriões de melhor qualidade obtidos em todos os ensaios realizados, a par com os formados em meio TMP2, como foi anteriormente referido. Isto indica que do ponto de vista da adsorção de auxinas os ensaios com carvão activado foram bem sucedidos e mais ensaios deverão ser efectuados de forma a determinar-se a concentração mais adequada desta substância na geração de um número superior de embriões com elevada qualidade.

4.3.3- Ácido abscísico

A adição de ABA a culturas embriogénicas *in vitro* inibe a germinação precoce de embriões, estimula uma maturação coordenada dos embriões somáticos (Dodeman *et al.*, 1997; Nawrot-Chorabik, 2012) e promove o seu desenvolvimento em plantas com morfologia normal (Jiménez, 2001).

O ABA serve também de mensageiro químico em respostas de stresse. Relatos indicam que os agregados celulares embriogénicos contêm níveis endógenos de ABA mais elevados que o calo não-embriogénico (Karami e Saidi, 2010). Contudo uma exposição demasiado prolongada a esta substância pode suprimir o crescimento das plantas formadas *in vitro* (Gutiérrez-Mora *et al.*, 2012). Foram também relatadas situações em que a aplicação de ABA parece estar envolvida no estímulo da divisão celular e da síntese de DNA, na produção de calo e na morfogénese do caule (Jiménez, 2001).

Em *Psidium guajava*, Rai e a sua equipa (2008) verificaram uma tendência no aumento da percentagem de embriões somáticos formados em função do aumento da concentração de ABA. O mesmo tipo de resposta foi observada em *Carica papaya* (Anandan *et al.*, 2012). Em tamarilho, também já foram realizados ensaios com ABA verificando-se a sua importância no desenvolvimento de embriões somáticos, brancos e opacos, quando o meio MS era composto por 0,11 M de sacarose e 2 mg/l de ABA, em culturas mantidas ao escuro (Correia *et al.*, 2012).

No trabalho realizado pretendeu-se estudar o efeito de concentrações mais baixas (1 mg/l) e mais elevadas (4 mg/l) de ABA aos meios de maturação de diferentes tipos de calo embriogénico. Os resultados obtidos demonstraram que, de facto, o ABA é importante na formação de um número elevado de embriões somáticos em estado torpedo ou cotiledonar, uma vez que os meios aos quais foi adicionada esta substância foram aqueles, de todos os ensaios de maturação realizados, os que produziram um número superior de embriões, no caso do calo TV-CE1. No meio TMA2 (2 mg/l de ABA) foi onde se revelou um número superior de embriões formados, o que vai de encontro aos resultados previamente obtidos em tamarilho (Correia *et al.*, 2012), e o meio TMA1 (1 mg/l de ABA), que correspondente à menor concentração de ABA testada, foi quele onde se desenvolveu um número inferior de embriões em estados desenvolvidos, o que comprova a reacção positiva do calo TV-CE1 à presença de ABA no meio de cultura.

Dos 2 calos em estudo, apenas houve uma resposta no sentido da formação de embriões por parte do calo TV-CE1. Embora o calo TV-CE2 seja do mesmo genótipo e tenha sido induzido mais recentemente a sua capacidade embriogénica revelou-se inferior em todos os tratamentos realizados. Isto pode ser explicado devido a anomalias citogenéticas e à redução do potencial embriogénico, características de culturas estabelecidas há muito tempo (Currais *et al.*, 2013), que podem ter sido agravadas pelas repicagens sucessivas a que este calo foi alvo.

4.3.4- Agentes oxidativos

O stresse oxidativo tem sido induzido em várias espécies de angiospérmicas para tentar relacionar o papel deste tipo de stresse na morfogénese vegetal (Ma *et al.*, 2012). Alguns autores têm sugerido uma correlação entre o aumento da atividade de enzimas antioxidantes, relacionado com o stresse oxidativo e a resposta embriogénica dos tecidos somáticos (Carvalho *et al.*, 2009). Contudo ainda pouco é sabido acerca de parâmetros fisiológicos específicos, de como as espécies reactivas ao oxigénio e o sistema antioxidante, possam afectar a embriogénese somática (Ma *et al.*, 2012).

Em *Lycium barbarum*, medições dos níveis intracelulares de H₂O₂ revelaram que a diferenciação de células embriogénicas é afectada pela presença desta substância, uma vez que esses níveis foram mais elevados na formação de células embriogénicas que no próprio calo (Kairong *et al.*, 1999). O mesmo estudo revelou que nos tratamentos com H₂O₂, o aumento da concentração desta substância conduz a uma maior frequência de embriões somáticos e Kairong e a sua equipa sugerem que isto se deve ao facto de níveis exógenos de H₂O₂ aumentarem os níveis internos desta substância. No entanto a partir de determinadas concentrações de peróxido de hidrogénio esta substância impede o processo de maturação (Kairong *et al.*, 1999), o que vai de encontro aos resultados que foram obtidos neste trabalho, em tamarilho. Quando foi comparado o número de embriões formados em meio com e sem peridrol verificou-se um incremento de embriões em estado torpedo e cotiledonar em meios suplementados com a substância em questão. Apesar disto, meios com menores concentrações de H₂O₂ foram os que formaram um número superior de embriões somáticos e a partir dessa concentração a frequência de embriões originados começa a decrescer, isto porque a partir dessa concentração, o stresse causado ao material vegetal pode estar a ser demasiado elevado e a impedir uma resposta morfológica

adequada por massas de calo mais sensíveis. À semelhança do que se verificou com os ensaios com ABA o calo TV-CE2 não respondeu e não houve a formação de embriões possivelmente devido ao motivo discutido na secção 4.3.4.

4.4- Maturação dos embriões somáticos a partir de culturas de tecido embriogénico obtidos em suspensões celulares

A eficácia de suspensões celulares no crescimento de calo embriogénico de tamarilho já foi comprovada em trabalhos desenvolvidos anteriormente no nosso laboratório (Alves, 2012). Em várias espécies, como no caso de *Quercus ilex*, têm sido utilizadas suspensões para obter massas superiores de calo mas para obter embriões somáticos maduros o mais comum é recorrer-se a meios gelificados (Mauri e Manzanera, 2003). No presente trabalho avaliou-se a eficácia da aplicação da maturação de embriões somáticos em meio líquido, através da utilização dos meios líquidos MS com 40 g/l de sacarose (TM2-1) e MS com 40 g/l de sacarose e 10 g/l de carvão activado (TMC-1).

No meio TM2-1 a única resposta observada foi um aumento visual da massa de tecido embriogénico sem que se verificasse a formação de embriões somáticos em estados desenvolvidos. Como foi anteriormente referido, na secção, 4.3.2, a presença de auxinas originárias da fase de indução é responsável por este tipo de resposta. Tendo em conta os resultados obtidos em meio solidificado, no que diz respeito sobretudo à qualidade dos embriões obtidos, procurou-se aplicar a metodologia do carvão activado também à maturação em meio líquido, de forma a conseguir-se remover eficientemente a auxina ainda presente, promovendo assim o desenvolvimento de embriões somáticos. Esta estratégia permitiu colmatar o problema que levou ao não desenvolvimento de embriões com o meio TM2-1. O carvão activado, é um composto que pelas suas propriedades, adsorve compostos do meio e nestes ensaios o seu efeito revelou-se eficiente na adsorção de auxinas, o que permitiu o desenvolvimento de embriões somáticos. Os embriões somáticos formados revelaram ser de boa qualidade, apresentando uma tonalidade branca opaca que indica uma boa acumulação de substâncias de reserva. No entanto, estes embriões apresentaram dimensões mais reduzidas face aos embriões formados em meio TMC solidificado, provavelmente devido ao facto de terem sido formados em meio líquido sobre agitação, o que levou a uma maior separação de embriões do calo, tal como descrito

em outros trabalhos (Mauri e Manzanera, 2003). Também em *Carica papaya*, há registos do aumento do número de embriões em estado cotiledonar em meios líquidos face a um controlo em meio gelificado (Anandan *et al.*, 2012). Nos ensaios realizados o resultado foi semelhante quando se utilizou calo TV-CE1, embora isso não se tenha verificado com o TV-CE2, onde o controlo (o meio solidificado) foi mais eficiente na formação de embriões. Este facto indica que a aplicação de carvão activado neste tipo de culturas terá também que ser otimizada face ao material em cultura. À semelhança do que se verificou para outros tratamentos, a linha embriogénica TV-CE2 revelou uma menor capacidade de resposta, que poderá ser ultrapassada por uma optimização das condições de cultura utilizadas.

4.5- Germinação dos embriões somáticos formados

A germinação de embriões somáticos e a regeneração de plântulas completas, com todos os elementos que lhes são característicos, não foi conseguida, nestes ensaios. Alguns dos embriões transferidos para meio de germinação ainda se começaram a desenvolver, contudo a determinada altura o crescimento cessou e estes oxidaram ou desdiferenciaram-se.

Esta resposta pode ser explicada devido aos elevados períodos de tempo a que os calos foram induzidos e a um número elevado de subculturas. Currais *et al.* estudaram a estabilidade na ploidia de culturas embriogénicas e concluíram que as culturas de tamarilho são propensas a alterações cromossómicas, como um número anormal de cromossomas, que se podem manifestar logo após o primeiro ano em cultura e que tendem a aumentar com o tempo (Currais *et al.*, 2013).

4.6- Análises morfológicas e histológicas

As análises histológicas e de SEM permitiram caracterizar as diferentes fases do processo embriogénico, desde a formação dos calos embriogénicos ao desenvolvimento dos embriões. Assim, no tecido pro-embriogénico encontram-se recorrentemente células em divisão o que mostra a capacidade de proliferação deste tecido em meios com auxina. Em fases mais adiantadas do processo, foi possível observar a formação de células com um elevado teor de amido, o que pode indiciar um papel deste composto em termos energéticos no processo de formação dos embriões somáticos. A análise de calo embriogénico, tanto à lupa como recorrendo a técnicas de microscopia, permitiu concluir que este tecido é composto por um agregado de massas com uma forma esférica. Estas massas quando transferidas para meio de maturação desenvolvem-se em embriões somáticos (Guimarães *et al.*, 1996; Correia *et al.*, 2012), o que leva a crer que se trata de embriões somáticos em estados iniciais de desenvolvimento, mais concretamente no estado globular. Juntamente com os embriões são isoladas massas de calo embriogénico que são impossíveis remover, para meio de germinação, onde este tecido mantém a capacidade proliferativa. A observação deste calo à lupa e ao microscópio electrónico de varrimento revelou que a estrutura destas massas era um agregado compacto de estruturas mais ou menos globulares, aparentemente de embriões em estádios muito precoces. As células destas massas são pobres em substâncias de reserva, nomeadamente amido o que parece indicar um elevado consumo energético em fases anteriores.. A maioria dos embriões somáticos formados revelou anomalias já relatadas anteriormente como cotilédones fundidos, germinação precoce ou um número alterado de cotilédones (Correia e Canhoto, 2012). Os cortes histológicos realizados revelaram que o meristema apical do caule está presente, pelo menos nos embriões analisados, o que permite concluir que a ausência de germinação muitas vezes observada se deve a outros factores que não a ausência de diferenciação desta zona meristemática.

4.7- Níveis de peróxido de hidrogénio endógeno

Existem diversos registos em espécies vegetais que procuram explicar o papel do stresse oxidativo na morfogénese vegetal (Libik *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2012), nomeadamente o papel do peróxido de hidrogénio como molécula-chave entre os mecanismos de stresse e as vias de regeneração. Pensa-se que o H_2O_2 poderá ter o papel de mensageiro secundário nas vias de transdução de sinal que influenciam a expressão de genes envolvidos nos processos morfogénicos (Neill *et al.*, 2002; Vranová *et al.*, 2002). Neste sentido, diversos trabalhos estabelecem a relação entre níveis elevados de peróxido de hidrogénio e o potencial embriogénico de linhas de calo (Kairong *et al.*, 1999; Libik *et al.*, 2005).

Os resultados revelaram valores internos de peróxido de hidrogénio mais elevados no calo TV-CE1 e no TV-CE2, o que pode estar relacionado com o potencial embriogénico associado a estes dois tipos de calo (Kairong *et al.*, 1999). O calo não embriogénico (CNEB) utilizado como controlo, apresentou níveis baixos desta substância, semelhantes aos níveis apresentados por TJ-CE3, o que poderá justificar a ausência de resposta embriogénica por parte desta linha de calo. A linha TJ-CE3 trata-se de uma linha de calo embriogénico induzida a partir de material de uma árvore adulta estabelecido *in vitro*. Trabalhos anteriores relataram a capacidade embriogénica desta linha (Correia *et al.*, 2011), que no presente trabalho demonstrou ter perdido essa capacidade independentemente do tratamento aplicado. A constatação de níveis endógenos de H_2O_2 semelhantes aos observados para calo não embriogénico, poderão estar na base da ausência de resposta devido a uma não activação das vias de regulação genética que seriam activadas para valores endógenos mais elevados deste composto.

A análise dos ensaios com TV-CE2, no entanto revelou-se contrária ao esperado, na medida em que este calo apresentou os valores endógenos de peróxido de hidrogénio mais elevados do ensaio, inclusive mais elevados que os valores registados para o TV-CE1, que foi o material que demonstrou a maior capacidade embriogénica. Com os valores mais elevados de H_2O_2 , seria de esperar que o TV-CE2 fosse o calo com uma maior capacidade embriogénica, o que não se verificou.

Nos resultados obtidos há que ter em consideração que TV-CE1 e CNEB, têm a mesma origem e foram induzidos e mantidos em subculturas sucessivas desde a mesma

4. Discussão

altura, tal como TV-CE2 e TJ-CE3, que apesar de terem origens diferentes, foram também induzidos na mesma altura, ainda que mais recentemente que TV-CE1 e CNEB. Este facto poderá ser importante na avaliação dos resultados obtidos, uma vez que os diferentes períodos de manutenção dos calos em cultura poderão também afectar os níveis de H_2O_2 registados.

Os resultados obtidos apontam para o potencial desta informação na avaliação da capacidade embriogénica das linhas de calo obtidas após um processo de indução. Desta forma é importante que se realizem mais ensaios, de forma a conseguir boas correlacções entre os níveis endógenos de H_2O_2 dos diferentes tipos de calo e a sua capacidade embriogénica e/ou a sua idade.

5. Conclusões e perspectivas Futuras



5. Conclusões e perspectivas futuras

O recurso às técnicas de cultura *in vitro* de espécies vegetais tem sido uma das ferramentas mais úteis no melhoramento genético dos cultivares e na manutenção de espécies de interesse, permitindo a sua propagação em larga escala. A embriogénese somática tem sido a técnica de eleição para alcançar estes fins porém a compreensão dos mecanismos básicos que lhe estão associados continua a ser uma das maiores preocupações no que diz respeito à optimização de protocolos.

A transição ineficiente de massas pro-embriogénicas em embriões desenvolvidos é um processo que demonstrou ter alguns problemas associados, como o desenvolvimento assíncrono de embriões, a formação de embriões anómalos e embriões que germinaram precocemente. Um dos principais objectivos deste trabalho passou pela optimização de protocolos de maturação de embriões somáticos de modo a tentar minimizar as limitações desta técnica e passou pela aplicação de determinados procedimentos: i) a contagem do número de embriões normais e anómalos formados em cada tratamento, ii) a avaliação da qualidade dos embriões com base na sua cor, iii) análises histológicas aos embriões e iv) a transferência de embriões para meio de germinação.

Na contagem do número de embriões somáticos formados notou-se uma melhor resposta, à excepção dos tratamentos com osmóticos, do calo TV-CE1 aos compostos testados, especialmente ao peróxido de hidrogénio, onde o número de embriões total foi superior. Por oposição, o calo TJ-CE3 não reagiu a nenhum dos tratamentos, mantendo sempre o seu aspecto embriogénico. O TV-CE2, por ser o calo embriogénico induzido há menos tempo, era de esperar que fosse o que tivesse melhor resposta na formação de embriões, mas isso apenas se verificou, de uma forma geral, com os compostos osmóticos, talvez por este calo ter sido sujeito a repicagens de forma mais intensa no início dos ensaios. Verificou-se a necessidade de testar mais compostos, em trabalhos futuros, como outras fontes de carbono, aminoácidos, água de coco, extrato de malte ou outros gelificantes.

Os ensaios histológicos realizados revelaram que mesmo em embriões anómalos o meristema apical se organizou de acordo com o padrão normal, encontrando-se organizado num pequeno e denso aglomerado de células, com uma elevada actividade mitótica. Estes dados sugerem que este tipo de embriões, embora anómalos, se iria conseguir desenvolver de uma forma normal e atingir a conversão em plântulas.

5. Conclusões e perspectivas futuras

Neste trabalho foram também desenvolvidos ensaios na indução de embriogénese somática onde a função da composição do meio, do genótipo e do tamanho do explante inicial na formação de calo embriogénico foram avaliados. O tamanho do explante revelou ser um factor importante na quantidade de calo formado. Nos ensaios decorridos neste trabalho a quantidade de calo formada não foi quantificada, apenas se conseguiu observar visualmente que era superior em explantes fragmentados. Em trabalhos futuros seria interessante fazer essa quantificação e comparar a massa de calo embriogénico formada em explantes fragmentados e em secções foliares inteiras. Seria também interessante fragmentar ainda mais o explante de modo a avaliar até que ponto é que a fragmentação do explante inicial promove a formação de maiores massas de calo embriogénico.

Foram ainda desenvolvidos ensaios de organogénese *in vitro*, na sequência de um trabalho prévio, desenvolvido no nosso laboratório, em que se recorreu a tamarilho vermelho com origem seminal, como foi anteriormente referido (Santos, 2012). Ao recorrer a material de tamarilho vermelho proveniente de material adulto, no presente trabalho, verificou-se que este material levou à formação de um número de rebentos gerados mais baixo que os que se criaram no trabalho de Santos. Esta resposta pode ser em parte explicada com a recalcitrância do material adulto mas também porque os meios seleccionados para os presentes ensaios (os que revelaram melhores respostas no trabalho anterior) podem não ser indicados para material adulto. Desta forma seria interessante, no futuro, realizar ensaios em meios com outras composições, de forma a determinar que factor foi mais importante na fraca resposta organogénica observada, se a origem dos explantes, se a inadequada composição do meio.

6. Bibliografia



6. Bibliografia

- Acosta-Quezada PG, Martínez-Laborde JB e Prohens J (2011) Variation among tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.) accessions from different cultivar groups: implications for conservation of genetic resources and breeding. *Genetic Resources and Crop Evolution* 58: 943-960.
- Agarwal S, Kanwar K, Sharma DR (2004) Factors affecting secondary somatic embryogenesis and embryo maturation in *Morus alba* L. *Sci. Hort.*, 102: 359–368.
- Alves ACS (2012) Ensaio de embriogênese somática e transformação genética em tamarilho (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.). Universidade de Coimbra.
- Anandan R, Sudhakar D, Balasubramanian P, Gutiérrez-Mora A (2012) In vitro somatic embryogenesis from suspension cultures of *Carica papaya* L. *Scientia Horticulturae* 136: 43-49.
- Angulo-Bejarano PI and Paredes-López O (2011) Development of a regeneration protocol through indirect organogenesis in prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill). *Scientia Horticulturae* 128: 283-288.
- Anjum M, Ali H (2004) Effect of culture medium on direct organogenesis from different explants of various potato genotypes. *Biotechnology* 3: 187-193.
- Aslam J, Khan SA, Cheruth AJ, Mujib A, Sharma, MP, Srivastava PS (2011) Somatic embryogenesis, scanning electron microscopy, histology and biochemical analysis at different developing stages of embryogenesis in six date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. *Saudi Journal of Biological Sciences* 18: 369-380.
- Atkinson RG, Gardner RC (1993) Regeneration of transgenic tamarillo plants. *Plant Cell reports* 12: 347-351.
- Avni A, Blázquez MA (2011) Can plant biotechnology help in solving our food and energy shortage in the future? *Current Opinion in Biotechnology* 22: 220-223.
- Bansal Y, Pandey P (1993) Micropropagation of *Sesbania aculeata* (Pers.) by adventitious organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32: 351-355.
- Capron A, Chatfield S, Provart N, Berleth T, (2009) Embryogenesis: pattern formation from a single cell. *The Arabidopsis Book* 7: 1-28. Disponível em <http://arabidopsisbook.org/> . Acedido em Abril de 2013.
- Bohs L (1989) Ethnobotany of the genus *Cyphomandra* (Solanaceae). *Economic Botany* 43: 143-163.

6. Bibliografia

- Borlaug NE (2000) Ending world hunger. The promise of biotechnology and the threat of antiscience zealotry. *Plant Physiology* 124: 487-490.
- Borlaug NE, Dowswell CR (2005) Feeding a world of ten billion people: a 21st century challenge. Proceedings of the international congress “In the Wake of the Double Helix: From the Green Revolution to the Gene Revolution”. 3–23
- Brown TA, Jones MK, Powell W, Allaby RG (2008) The complex origins of domesticated crops in the Fertile Crescent. *Trends in Ecology & Evolution* 24: 103-109.
- Cailloux F, Julien-Guerrier J, Linossier L, Coudret A (1996) Long-term somatic embryogenesis and maturation of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*. *Plant Science* 120: 185-196.
- Canhoto JM, Correia SI, Marques CI (2009) Factors affecting somatic embryogenesis induction and development in *Feijoa sellowiana* Berg. *Acta Hort* 839: 147 - 156.
- Canhoto JM, Lopes ML, Cruz GS (2005) Protocol for somatic embryogenesis: tamarillo (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.). In: SM Jain, PK Gupta (Eds.) Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody plants, Dordrecht, Springer, pp. 379-389.
- Canhoto JM, Rama S, Cruz GS (2006) Somatic embryogenesis and plant regeneration in carob (*Ceratonia siliqua* L.). *In vitro Cell Dev Biol* 42: 514 –519.
- Canhoto JM (2010) Biotecnologia Vegetal: da Clonagem de Plantas à Transformação Genética. Imprensa da Universidade de Coimbra. Coimbra
- Carvalho JMFC, Silva MMA, Câmara TR (2009) Mecanismos antioxidativos associados à embriogênese somática. Embrapa Algodão. 223.
- Chagas EA, Pasqual M, Ramos JD, Pio LAS, Dutra LF, Cazetta O (2005) Cultivo de embriões imaturos de citros em diferentes concentrações de carvão ativado e ácido giberélico. *Ciência e Agrotecnologia* 29: 1125-1131.
- Chitra D, Padmaja G (2005) Shoot regeneration via direct organogenesis from in vitro derived leaves of mulberry using thidiazuron and 6-benzylaminopurine. *Scientia Horticulturae*. 106: 593-602.
- Cohen D, van den Brink RC, MacDiarmid RM, Beck DL, Forster RL (2000) Resistance to tamarillo mosaic virus in transgenic tamarillos and expression of the transgenes in F1 progeny. *Acta Hort* 521: 43 -49.
- Corredoira E, Ballester A, Vieitez AM (2003) Proliferation, maturation and germination of *Castanea sativa* Mill. somatic embryos originated from leaf explants. *Annals of Botany*. 92:129–136.

6. Bibliografia

- Correia S, Cunha AE, Salgueiro L, Canhoto JM (2012) Somatic embryogenesis in tamarillo (*Cyphomandra betacea*): approaches to increase efficiency of embryo formation and plant development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 109: 143-152.
- Correia SI, Lopes ML, Canhoto JM (2009) Somatic embryogenesis in tamarillo (*Cyphomandra betacea*): recent advances. *Acta Horticulturae*. 839: 157 -164.
- Correia SI, Lopes ML, Canhoto JM (2011) Somatic embryogenesis induction system for cloning an adult *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (tamarillo). *Trees* 25: 1009-1020.
- Correia SI, Canhoto JM (2012) Biotechnology of tamarillo (*Cyphomandra betacea*): From *in vitro* cloning to genetic transformation. *Scientia Horticulturae* 148: 161-168.
- Currais L, Loureiro J, Santos C, Canhoto JM (2013) Ploidy stability in embryogenic cultures and regenerated plantlets of tamarillo. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 114: 149-159.
- García E, Martínez S (1995) Somatic Embryogenesis in *Solanum tuberosum* L. cv. Désirée from Stem Nodal Sections. *Journal of Plant Physiology* 145: 526-530.
- de Vries SC, Booij H, Meyerink P, Huisman G, Wilde HD, Thomas TL (1988) Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension cultures. *Planta* 176: 196-204.
- Deo PC, Tyagi AP, Taylor M, Harding R, Becker D (2010) Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. *The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences* 28: 27-40.
- Dodeman VL, Ducreux G, Kreis M (1997) Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany* 48: 1493-1509.
- Eagles R, Gardner R, Forster R (1994) Incidence and distribution of six virus infecting Tamarillo (*Cyphomandra betaceum*) in New Zealand. *New Zealand Journal of Crop Horticultural Science* 22: 453-458.
- Federico G (2005) *Feeding the World: An Economic History of World Agriculture, 1800-2000*, Princeton University Press. pp.1.
- Fehér A, Pasternak TP, Dudits D (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 201-228.
- Fowler JAP, Sturion JA (2000) Aspectos da formação do fruto e da semente na germinação da erva-mate. *Embrapa Florestas. Comunicado Técnico*, 45

6. Bibliografia

- Gahakwa D, Asiimwe T, Senkensha N, Kajuga J, Rukundo P, Munganyinka E, Kahia J (2013) Biotechnology for Improving Food Security in Rwanda. *Rwanda Journal* 28: 95-106.
- Gaj MD (2001) Direct somatic embryogenesis as a rapid and efficient system for in vitro regeneration of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64: 39-46.
- Gaj MD (2004) Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation* 43: 27-47.
- Gatita IC, Almeida J (2003) Micropropagación del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn.), solanaceae silvestre usada en la alimentación humana. *Revista Forest. Venez* 47: 9-13.
- Geneve RL (2001) *Plant propagation; Principles and Practices*. 7th Edition. Agricultural sciences. Vol. I. Disponível em <http://www.eolss.net/sample-chapters/c10/E5-24-02-02.pdf>. Acedido em Março de 2013.
- Goldberg RB, Paiva G, Yadegari R (1994) Plant embryogenesis: zygote to seed. *Science* 266: 605-614
- Golle DP, Reiniger LRS, Curti AR (2009) Melhoramento florestal: ênfase na aplicação da biotecnologia. *Ciência Rural, Santa Maria* 39: 1606-1613
- Guimarães M, Tomé M, Cruz G (1996) *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn.(Tamarillo). *Biotechnology in agriculture and forestry, Trees IV*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 120-137.
- Guimarães ML, Cruz GS, Montezuma-de-Carvalho JM (1988) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 15: 161-167.
- Gustafson FG (1936) Inducement of fruit development by growth-promoting chemicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 22: 628.
- Gutiérrez-Mora A, González-Gutiérrez AG, Rodríguez-Garay B, Ascencio-Cabral A, Li-Wei L (2012) Plant Somatic Embryogenesis: Some Useful Considerations, Ken-ichi Sato (ed.) *Embryogenesis*, Rijeka: InTech. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/embryogenesis/somatic-embryogenesis-some-useful-considerations>. Acedido em Março de 2013

6. Bibliografia

- Haccius B, Lakshmanan KK (1965) Adventiv-embryonen aus *Nicotiana-Kallus* der bei hohen lichtintensitäten kultiviert wurde. *Planta* 65: 102-104
- Hazarika B (2006) Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. *Scientia Horticulturae* 108: 105-120.
- Heiser C, Anderson G (1999) "New" solanums. In: Perspectives on new crops and new uses. J. Janick (ed.) pp. 379–384.
- Heringer AS, Barroso T, Silveira V (2010) Expressão diferencial de proteínas durante a maturação de embriões somáticos em *Carica papaya L.*" II Congresso Fluminense de Iniciação Científica e Tecnológica
- Hicks GS (1980) Patterns of organ development in plant tissue culture and the problem of organ determination. *The Botanical Review* 46: 1-23.
- Hicks GS (1994) Shoot induction and organogenesis in vitro: a developmental perspective. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 30: 10-15.
- Ikeda-Iwai M, Umehara M, Satoh S, Kamada H (2003) Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 34: 107-114.
- Jiménez VM (2001) Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 13: 196-223.
- Kairong C, Gengsheng X, Xinmin L, Gengmei X, Yafu W (1999) Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum L.* *Plant Science* 146: 9-16.
- Kantharajah A, Golegaonkar P (2004) Somatic embryogenesis in eggplant. *Scientia Horticulturae* 99: 107-117.
- Karami O, Saidi A (2010) The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. *Molecular Biology Reports* 37: 2493-2507.
- Komatsuda T, Lee W, Oka S (1992) Maturation and germination of somatic embryos as affected by sucrose and plant growth regulators in soybeans *Glycine gracilis* Skvortz and *Glycine max (L.) Merr.* *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 28: 103-113.
- Körbes AP, Droste A (2005) Carbon sources and polyethylene glycol on soybean somatic embryo conversion. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 40: 211-216.

6. Bibliografia

- Kumar V, Naidu MM, Ravishankar GA (2006) Developments in coffee biotechnology- *in vitro* plant propagation and crop improvement. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 87: 49-65.
- Libik M, Konieczny R, Pater B, Slésak I, Miszalski (2005) Differences in the activities of some antioxidant enzymes and in H₂O₂ content during rhizogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of the ice plant. *Plant Cell Reports* 23: 834-841.
- Linossier L, Veisseire P, Cailloux F, Coudret A (1997) Effects of abscisic acid and high concentrations of PEG on *Hevea brasiliensis* somatic embryos development. *Plant Science* 124: 183-191.
- Lopes ML, Ferreira MR, Carloto JM, Cruz GS, Canhoto JM (2000) Somatic embryogenesis induction in tamarillo (*Cyphomandra betacea*). In: SM Jain, PK Gupta, RJ Newton (Eds.) *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, vol. 6. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, pp. 433-455.
- Ma L, Xie L, Lin G, Jiang S, Chen H, Li H, Takáč T, Šamaj J, Xu C (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.
- Magioli C, Rocha APM, Oliveira DE, Mansur E (1998) Efficient shoot organogenesis of eggplant (*Solanum melongena* L.) induced by thidiazuron. *Plant Cell Reports* 17: 661-663.
- Mauri P, Manzanera J (2003) Induction, maturation and germination of holm oak (*Quercus ilex* L.) somatic embryos. *Plant cell, tissue and organ culture* 74: 229-235.
- McCane J, Widdowson D (1992) *Fruit and nut. The composition of foods*. 5th ed. Unwin & Buss, London, Holland 74-77.
- Meadows LR (2002) Growing tamarillo relatives. In: *The New Zealand Home Garden*. www.naturalhub.com. Acedido em Março de 2013.
- Minocha SC, Minocha R (1995) Historical aspects of somatic embryogenesis in woody plants. In: Jain MS, Gupta PG, Newton RJ (eds) *Somatic Embryogenesis in Woody Plants Vol 1* The Netherlands, Kluwer Academic Publishers., pp. 9-22.
- Montalbán IA, de Diego N, Moncaleán P (2010) Bottlenecks in *Pinus radiata* somatic embryogenesis: improving maturation and germination. *Trees* 24: 1061-1071.

6. Bibliografia

- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473 -497.
- Namasivayam P (2007) Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 90: 1-8.
- Nawrot-Chorabik K (2011) Somatic embryogenesis in forest plants. Ken-ichi Sato (ed.) *Embryogenesis*, Rijeka: InTech 20: 423-446. Disponível em : <http://www.intechopen.com/books/embryogenesis/somatic-embryogenesis-in-woody-plants>. Acedido em Março de 2013
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Hancock JT (2002) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J Exp Bot* 53: 1237–1247
- Pantoja L, Pinto D, Lopes C, Gandra R, Santos AS (2009) Caracterização física e físico-química de frutos de duas variedades de tamarilho oriundas do Norte de Minas Gerais. *Revista Brasileira de Fruticultura* 31: 916-919.
- Park YS, Pond SE, Bonga JM (1994) Somatic embryogenesis in white spruce (*Picea glauca*): genetic control in somatic embryos exposed to storage, maturation treatments, germination, and cryopreservation. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 742-750.
- Perán-Quesada R, Sánchez-Romero C, Barceló-Muñoz A, Pliego-Alfaro F (2004) Factors affecting maturation of avocado somatic embryos. *Sci Hortic* 102: 61-73
- Prohens J, Ruiz JJ, Nuez F (1996) Advancing the tamarillo harvest by induced postharvest ripening. *HortScience* 31: 109-111.
- Pullman GS, Montello P, Cairney J, Xu N, Feng X (2003). Loblolly pine (*Pinus taeda* L.) somatic embryogenesis: maturation improvements by metal analyses of zygotic and somatic embryos. *Plant Science* 164: 955-969.
- Quiroga PA (2008) Plantas Útiles Americanas El Tomate Árbol. *Biológica, Boletín de Divulgación de Temas Referidos a las Ciencias Biológicas* 8: 8-10
- Rai MK, Akhtar N, Jaiswal VS (2007) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. cv. Banarasi local. *Scientia Horticulturae* 113: 129-133.
- Rai MK, Jaiswal VS, Jaiswal U (2009). Effect of selected amino acids and polyethylene glycol on maturation and germination of somatic embryos of guava (*Psidium guajava* L.). *Scientia Horticulturae* 121: 233-236.
- Rao KS (1996) Embryogenesis in flowering plants: Recent approaches and prospects. *Journal of Biosciences* 21: 827-841.

6. Bibliografia

- Rodrigues MA, Kerbauy GB (2009) Meristemas: fontes de juventude e plasticidade no desenvolvimento vegetal. *Hoehnea* 36: 525-549.
- Rose RJ, Mantiri FR, Kurdyukov S, Chen SK, Wang XD, Nolan KE, Sheahan MB (2010). Developmental biology of somatic embryogenesis. In: *Plant developmental biology-biotechnological perspectives*, Vol 2 Springerpp. 3-26.
- Santa-Catarina C, Maciel SC, Pedrotti EL (2001) Germinação in vitro e embriogênese somática a partir de embriões imaturos de canela sassafrás (*Ocotea odorifera Mez*). *Revista Brasileira de Botânica* 24: 501-510.
- Santos ALM (2012) Estudos de organogênese em *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. Tese de Mestrado. Universidade do Porto.
- Sauner MV, Droste A (2005) Carvão ativado otimiza a produção de plantas de soja [*glycine max* (L.) Merr.] a partir da embriogênese somática. Livro de resumos do 51º Congresso Brasileiro de Genética Salão de iniciação Científica. São Paulo. pp. 593.
- Sghaier, B., Kriaa, W., Bahloul, M., Novo, J. V. J. and Drira, N. 2009. Affect of ABA, arginine and sucrose on protein content of date palm somatic embryos. *Scientia Horticulturae* 120: 379-85.
- Shoji M, Sato H, Nakagawa R, Funada R, Kubo T, Ogita S (2006) Influence of osmotic pressure on somatic embryo maturation in *Pinus densiflora*. *Journal of Forest Research* 11: 449-453.
- Slack J (1976) Growing tamarillos. *Agric Gaz NSW* 86: 2-4.
- Spurr AR (1969) A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research* 26: 31-43.
- Stasolla C, Yeung EC (2003) Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 15-35.
- Sugiyama M (1999) Organogenesis in vitro. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 61-64.
- Svobodová H, Albrechtová J, Kumstřová L, Lipavská H, Vágner M, Vondráková Z (1999). Somatic embryogenesis in Norway spruce: anatomical study of embryo development and influence of polyethylene glycol on maturation process. *Plant Physiology and Biochemistry* 37: 209-221.
- Taniguchi T, Kurita M, Itahana N, Kondo T (2004) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of Hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa* Sieb. et Zucc.). *Plant Cell Reports* 23: 26-31.

6. Bibliografia

- Thomas TD (2008) The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology advances* 26: 618-631.
- Thorpe T (1980) Organogenesis in vitro: structural, physiological, and biochemical aspects. *International review of cytology Suppl.* 11A, 71-111.
- Tonon G, Capuana M, Di Marco A (2001) Plant regeneration of *Fraxinus angustifolia* by in vitro shoot organogenesis. *Scientia Horticulturae* 87: 291-301.
- Troch V, Werbrouck S, Geelen D, van Labeke M (2009) Optimization of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) somatic embryo conversion. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 98: 115-123.
- Turk BA, Swartz HJ, Zimmerman RH (1994) Adventitious shoot regeneration from in vitro-cultured leaves of *Rubus* genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 38: 11-17.
- von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J, Filonova L (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 233-249.
- von Recklinghausen IR, Iwanowska A, Kieft H, Mordhorst AP, Schel JHN, van Lammeren AAM (2000) Structure and development of somatic embryos formed in *Arabidopsis thaliana* pt mutant callus cultures derived from seedlings. *Protoplasma* 211: 217-224.
- Vooková B, Kormuták A (2002) Some features of somatic embryo maturation of *Algerian fir*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 38: 549-551.
- Vranová, Inz D, van Bergusegem F (2002) Signal transduction during oxidative stress, *J Exp Bot* 53:1227–1236
- West M, Harada JJ (1993) Embryogenesis in higher plants: an overview. *The Plant Cell* 5: 1361-1369.
- Xing Y, Yu Y, Luo X, Zhang J-N, Zhao B, Guo Y-D (2010) High efficiency organogenesis and analysis of genetic stability of the regenerants in *Solanum melongena*. *Biologia Plantarum* 54: 231-236.
- Yang X, Zhang X (2010) Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Critical Reviews in Plant Science* 29: 36-57.
- Zimmerman J L (1993) Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *Plant Cell* 5: 1411–1423.