



# DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## Embriogénese somática e outros ensaios *in vitro* em duas espécies de loureiro (*Laurus nobilis* e *Laurus azorica*)

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

Renato Ferreira Baptista

---

2012

## Agradecimentos

No final deste trabalho, gostaria de agradecer às pessoas que tornaram possível a sua concretização pelos vários motivos.

Ao Dr. Jorge Canhoto pela sua orientação e paciência ao longo destes dois anos, um muito obrigado.

Ao Dr. Augusto Dinis e ao Dr. Dias pela ajuda e conselhos dados na realização dos cortes histológicos.

À Dra. Ludovina pelo acompanhamento e atenção dada numa fase inicial do trabalho.

À Dra. Maria João Pereira, Universidade dos Açores, pelo envio do material de *Laurus azorica*.

À D. Eulália por toda a disponibilidade em ajudar e simpatia demonstrada na realização do trabalho.

A todos os colegas de laboratório pelos bons momentos que passámos nestes dois anos, a eles um agradecimento especial.

A todos os meus colegas e amigos que conheci nestes anos em Coimbra, pelo convívio e bons momentos vividos.

Um especial agradecimento aos amigos com quem partilho o apartamento pela diversão e amizade partilhada.

No fim não podia deixar de agradecer a toda a minha família, em especial aos meus pais e irmão pelo apoio demonstrado em toda a minha vida.

A todos um muito obrigado

# Índice

<b>Resumo</b>	IV
<b>Abstract</b>	VI
<b>1. Introdução</b>	1
1.1. Introdução geral	2
1.2. Cultura <i>in vitro</i>	2
1.2.1. Cultura de meristemas	3
1.2.2. Organogénese	4
1.3. Embriogénese não zigótica	5
1.4. Embriogénese somática	6
1.5. Família Lauraceae	10
1.5.1. <i>Laurus nobilis</i> e <i>Laurus azorica</i>	11
1.5.2. Embriogénese somática em Lauraceae	13
1.6. Enquadramento do trabalho	14
1.7. Objectivos	15
<b>2. Materiais e métodos</b>	16
2.1. Estabelecimento de culturas	17
2.1.1. Material vegetal	17
2.1.2. Meio de cultura	17
2.1.3. Preparação do material vegetal	18
2.1.4. Cultura de gemas	19
2.1.5. Cultura de segmentos nodais de plântulas	20
2.2. Ensaios de diferenciação de embriões somáticos a partir de tecido embriogénico	21
2.2.1. Material utilizado	21
2.2.2. Meios de cultura	21

2.2.3. Estudos citológicos	23
2.3. Estudos histológicos	24
2.4. Indução de embriogénese somática em cotilédones de <i>Laurus nobilis</i> e <i>Laurus azorica</i>	24
2.4.1. Material utilizado	24
2.4.2. Meios de cultura	25
2.4.3. Preparação dos frutos	25
2.4.4. Obtenção de embriogénese somática secundária	26
<b>3. Resultados</b>	27
3.1. Estabelecimento de culturas	28
3.2. Manutenção das culturas embriogénicas	29
3.3. Desenvolvimento de embriões somáticos a partir do tecido embriogénico	30
3.3.1. Análise do crescimento das várias culturas caulinares	33
3.3.2. Análise citológica das culturas embriogénicas	33
3.4. Indução da embriogénese somática em cotilédones de <i>Laurus nobilis</i> e <i>Laurus azorica</i>	35
3.5. Estudos histológicos	40
<b>4. Discussão</b>	45
4.1. Estabelecimento de culturas	46
4.2. Manutenção das culturas embriogénicas	48
4.3. Desenvolvimento de embriões somáticos a partir do tecido embriogénico	49
4.4. Indução da embriogénese somática em cotilédones de <i>L. nobilis</i> e <i>L. azorica</i>	50
4.5. Estudos histológicos	53
<b>5. Conclusões e perspectivas futuras</b>	54
<b>6. Referências Bibliográficas</b>	56

## Resumo

O loureiro (*Laurus nobilis* L.) é uma árvore ou arbusto da família Lauraceae. Encontra-se distribuído por toda a bacia do Mediterrâneo onde as suas folhas são muito utilizadas na culinária. O loureiro-bravo (*Laurus azorica* (Seub.) Franco) é um arbusto ou árvore da mesma família cuja distribuição está limitada ao arquipélago dos Açores, sendo importante medidas de conservação da espécie, que já foi catalogada no livro vermelho das espécies ameaçadas. Ambas as espécies são dióicas e têm baixas taxas de germinação natural. A propagação por métodos convencionais também não ocorre com facilidade. Assim, estudos de embriogénese somática têm vindo a ser realizados, para implementar um protocolo de multiplicação *in vitro* destas espécies bem como para compreender melhor a embriogénese somática em lenhosas. A embriogénese somática é uma técnica de Biotecnologia Vegetal com grande potencial para propagação de plantas em larga escala. Neste trabalho tentou-se o estabelecimento das duas espécies quer a partir do material adulto, quer a partir de explantes jovens, tendo em vista o estabelecimento de um protocolo eficiente de micropropagação.

Duas auxinas, 2,4-D e Picloram, em diferentes concentrações, foram testadas na indução de embriogénese somática.

A análise histológica efectuada em diferentes fases da resposta embriogénica mostrou que a fraca germinação obtida em estudos anteriores, poderá dever-se às poucas reservas acumuladas pelos embriões somáticos, bem como à ausência de SAM em algumas secções de embriões somáticos.

A resposta mais comum foi a formação de calos embriogénicos, tendo sido testados vários meios para promover o seu desenvolvimento em embriões somáticos. A verificação da capacidade embriogénica em tecidos embriogénicos obtidos há treze anos em *L. nobilis* foi outro dos estudos efectuados, tendo-se verificado uma perda do potencial deste tecido evoluir em embriões somáticos. Apesar de a obtenção de embriões somáticos não ter sido conseguida, a acção do inibidor fluoridona foi interessante pela desdiferenciação que provocou no tecido embriogénico, tendo análises citológicas comprovado que o tecido proveniente da acção da fluoridona apresentava células com características meristemáticas, ao invés de todos os outros que apresentavam células com algum grau de diferenciação.

A embriogénese somática repetitiva é a obtenção de embriões somáticos secundários utilizando embriões somáticos primários como explante. A embriogénese secundária em *L. azorica* foi conseguida neste trabalho tendo sido utilizado o mesmo protocolo de *L. nobilis* já descrito na literatura.

**Palavras chave:** auxina; estudos histológicos; gemas caulinares; *in vitro*; tecido embriogénico.

## Abstract

The laurel (*Laurus nobilis* L.) is a tree or shrub of the family Lauraceae. The species is distributed throughout the Mediterranean basin where the leaves are widely used as a condiment. The wild laurel (*Laurus azorica* (Seub.) Franco) is also a shrub or small tree of the same family limited to the Azores islands being important to adopt measures of conservation for the species, which has been referenced in the red book of endangered species. Both species are dioecious and have low germination rates. The propagation by conventional methods of vegetative propagation is also difficult. Thus, studies of somatic embryogenesis have been carried out to implement a protocol for *in vitro* multiplication of these species as well as to better understand somatic embryogenesis in woody species. Somatic embryogenesis is a technique commonly used in Plant Biotechnology with great potential for large scale plant propagation. In this work we tried to establish the two species either from adult material, or from young explants in order to establish an efficient protocol of micropropagation.

Two auxin, 2,4-D and Picloram, at different concentrations were tested for somatic embryogenesis induction.

Histological analysis carried out in different stages of the embryogenic response showed that the low germination obtained in previous studies may be related to poor reserve deposition in somatic embryos as well as the absence of SAM in somatic embryos.

The most common response was the formation of embryogenic callus, and different media were tested to promote their development into somatic embryos. The verification of the embryogenic capacity in embryogenic tissues, obtained thirteen years ago from *L. nobilis*, was other study carried out. A loss of the embryogenic potential of this tissue to evolve into somatic embryos was found. Although somatic embryos were not obtained, it was found that the ABA inhibitor fluridone promotes the dedifferentiation of the embryogenic tissue, and cytological analyses showed the appearance of meristematic cells in this.

Repeated somatic embryogenesis is the formation of secondary somatic embryos, using primary somatic embryos as explants. Secondary embryogenesis in *L.*

*azorica* was achieved in this work using a protocol similar to that developed for *L. nobilis* already described in literature.

**Key words:** auxin; embryogenic tissue; histological studies; *in vitro*; shoot buds.



# 1. Introdução

---

## 1.1. Introdução geral

As plantas são seres autotróficos e têm um papel importantíssimo nos ecossistemas. O facto de serem seres produtores faz com que sejam a base das cadeias alimentares. Outro aspecto que torna estes organismos tão importante a nível ecológico é a capacidade de realizarem fotossíntese, processo em que ocorre libertação de oxigénio que é fundamental para a sobrevivência dos seres aeróbicos, são também um enorme sumidouro de dióxido de carbono, molécula que em excesso na atmosfera leva ao aumento considerável da temperatura.

Com todos estes *serviços* que as plantas fornecem é natural a sua exploração por parte da humanidade. De entre os materiais mais explorados destacam-se, a madeira, óleos, produtos utilizados pela indústria farmacêutica e cosmética, borracha, cortiça, entre outros, mas a maior exploração ocorre pela sua importância na alimentação humana e dos animais.

Desde sempre, como foi referido, a humanidade explorou os recursos fornecidos pelas plantas, mas, muitas vezes, sem olhar para a sustentabilidade, preocupando-se apenas com o lado económico. Actualmente, com o enorme crescimento populacional e de consumo, a exploração sustentável dos recursos tem de ser uma preocupação. Para tentar resolver alguns destes problemas várias disciplinas têm um papel importante, sendo uma delas, sem dúvida, a Biotecnologia Vegetal, que tem como objectivo explorar as plantas e/ou o seu metabolismo em benefício da humanidade. No âmbito desta disciplina, uma das metodologias que oferece grandes possibilidades em termos de propagação de plantas é a embriogénese somática, uma técnica de micropropagação, que se engloba num conjunto mais vasto de técnicas vulgarmente designadas como cultura *in vitro*.

## 1.2. Cultura *in vitro*

Cultura *in vitro* é o estabelecimento e manutenção de células, tecidos, órgãos vegetais, plantas ou massas de células denominadas calos, em condições laboratoriais, perfeitamente controladas em termos de composição dos meios de cultura e dos factores abióticos que controlam o seu desenvolvimento, (Chawla, 2009) . Estas técnicas podem ser usadas com vários objectivos tais como a proliferação celular com vista à obtenção

de metabolitos de interesse, à conservação de espécies ameaçadas, produção de haplóides, propagação de plantas geneticamente transformadas e clonagem (Canhoto, 2010). No que diz respeito a esta última possibilidade as técnicas de clonagem *in vitro* (micropropagação) têm vantagens sobre as técnicas tradicionais de propagação como a enxertia ou a estacaria (Iliev *et al.*, 2010). Essas vantagens relacionam-se com as menores dimensões do material utilizado, a possibilidade de realizar a multiplicação de uma forma menos dependente das condições ambientais e, em algumas espécies, as maiores taxas de sucesso obtidas com a propagação realizada *in vitro* (Chawla, 2009).

A micropropagação de plantas pode ser conseguida através de três processos com particularidades diferentes quer ao nível dos explantes utilizados quer das condições de cultura e do tipo de resposta obtido. Esses processos são a proliferação de meristemas, a organogénese e a formação de embriões somáticos (Canhoto, 2010).

### **1.2.1. Cultura de meristemas**

A cultura de meristemas caulinares é a técnica mais simples e a mais usada de micropropagação porque não envolve a formação de meristemas. Estes já se encontram no caule e apenas necessitam de concentrações relativamente elevadas de citocininas para se desenvolverem (Iliev *et al.*, 2010). Esta técnica é aplicada em muitas espécies com valor comercial ou em espécies objecto de programas de conservação, onde a propagação natural não ocorre com facilidade (Debnath, 2004), sendo uma boa forma de obter plantas em larga escala.

Como explante são utilizados os meristemas apicais ou os meristemas axilares. Dada a dificuldade em isolar apenas as zonas meristemáticas, o que na realidade se cultiva *in vitro* são ápices e segmentos nodais das plantas a propagar (George *et al.*, 2008). Uma vez que nesta metodologia o objectivo é promover o desenvolvimento de meristemas já existentes na planta mãe, a variabilidade genética nas plantas regeneradas é mínima, em virtude de, por norma, não ocorrer a formação de calo, muitas vezes uma fonte de variabilidade genética dada a instabilidade das células em cultura (von Arnold, 2008). As principais limitações desta técnica são o seu custo elevado e a dificuldade em ser aplicada em muitas espécies lenhosas (Canhoto, 2010). O enraizamento ulterior dos calos, a ocorrência de oxidação fenólica e a contaminação com microrganismos são

outras limitações. No entanto, a qualidade fitossanitária das plantas, a possibilidade de obter plantas livres de vírus a partir de material contaminado e as elevadas taxas de propagação compensam as limitações e fazem com que os produtores estejam dispostos, muitas vezes, a adquirir material vegetal a um preço mais elevado.

### **1.2.2. Organogénese**

A organogénese é, segundo a definição de Vasil & Thorpe (1994), o processo onde células e tecidos são forçados a sofrer alterações que levam à formação de uma estrutura unipolar, sendo esta um primórdio caulinar ou radicular, tendo um sistema vascular ligado ao tecido que lhes deu origem.

Neste caso, o explante utilizado não possui meristema, tendo este de ser formado *de novo*. Os meristemas podem ser formados directamente do explante da planta mãe, ou por via indirecta onde se forma uma estrutura desorganizada (calo) e a partir desta formam-se os meristemas (George *et al.*, 2008). Os meristemas assim formados são chamados adventícios e o processo denomina-se caulogénese se ocorrer a formação de um caule e rizogénese se a estrutura formada for uma raiz (George *et al.*, 2008).

A ocorrência de organogénese ocorre devido à acção conjunta de reguladores de crescimento, nomeadamente de auxinas e citocininas (Skoog & Miller, 1957; George *et al.*, 2008), sendo que o balanço na relação auxinas/citocininas é importante (Thorpe, 1980).

Na organogénese, o que se pretende obter são rebentos caulinares que se podem enraizar originando plantas (Canhoto, 2010). Assim, neste processo de micropropagação têm de ocorrer dois tipos de organogénese, uma organogénese caulinar primeiro e, numa fase seguinte, a organogénese radicular o que pode tornar o procedimento moroso e difícil de aplicar. (George *et al.*, 2008). No entanto, o número de rebentos que se pode formar é elevado, podendo surgir no mesmo explante, várias dezenas, embora para espécies lenhosas este método seja por norma pouco eficaz, sendo essa uma das suas principais limitações (Canhoto, 2010).

### 1.3. Embriogênese não zigótica

Embriogênese é a designação aplicada a todos os processos envolvidos na formação de um embrião a partir de uma célula (Capron *et al.*, 2009). Essa célula é normalmente o zigoto, resultante, da fusão entre um gâmeta masculino e um gâmeta feminino. Este processo ocorre em todas as plantas, embora nas angiospérmicas o processo seja mais complexo. No grupo das angiospérmicas, para além da fusão dos gâmetas, ocorre a fusão do segundo gâmeta masculino com a célula central, sendo o resultado a formação de uma célula triplóide que formará o endosperma (Park & Harada, 2008). Para o embrião sobreviver precisa de protecção, que lhe é fornecida pelo fruto, originado a partir do ovário e principalmente pela semente, originada a partir do óvulo. A semente é formada pela testa que se desenvolve a partir dos tegumentos do óvulo, pelo endosperma e pelo embrião (Bewley & Black, 1994).

Embora a embriogênese zigótica seja o modo mais natural de formar embriões, esta não é a única (Mordhorst *et al.*, 1997), sendo possível ocorrer a formação de embriões a partir de células somáticas na natureza. Este tipo de embriogênese apomítica é designada como embriogênese adventícia e o primeiro a descrevê-la foi Strasburger em 1878, (Strasburger, 1878; in Merkle *et al.*, 1995).

Um dos diferentes tipos de formação de embriões não zigóticos é a chamada poliembriõnia que ocorre em algumas famílias de angiospérmicas, como as Myrtaceae e Rutaceae. Nestes casos há formação de sementes com mais do que um embrião, tendo esses embriões origem em células somáticas dos tegumentos ou do nucelo (Koltunow *et al.*, 1996). A poliembriõnia é muito comum nas espécies do género *Citrus* (Koltunow, 1993).

A apomixia é um sistema de reprodução muito interessante pois trata-se da reprodução assexual por meio de sementes (Johri, 1984). Existem vários tipos de apomixia mas por regra os sacos embrionários formam-se a partir de células diplóides e o embrião resulta de um processo de partenogênese da oosfera diplóide (Koltunow *et al.*, 1995). Existem três tipos de apomixia, a adventícia, a diplospórica e a aplospórica, que variam consoante a origem do embrião. A apomixia adventícia é a formação de embriões com origem em células do óvulo diplóides, normalmente do nucelo (Ozias-Akins, 2006), embora eles também possam resultar da proliferação do suspensor ou do tegumento da semente, (Raghavan, 1986). Na apomixia diplospórica o saco embrionário

surge de células mãe do megásporo, por uma meiose incompleta, havendo formação de núcleos de restituição. Os núcleos de restituição são diplóides e os embriões formam-se a partir deles apresentam também este nível de ploidia (Dodeman *et al.*, 1997). Na aposporia há a formação do saco embrionário directamente por mitose, por uma célula que não a célula mãe dos macrósporos sem haver meiose. Em termos práticos, a apomixia é potencialmente muito interessante pois permite a clonagem da planta mãe através da formação de sementes. No entanto, ela não é muito comum em espécies utilizadas na agricultura, pelo que a sua aplicação prática é ainda reduzida (Canhoto, 2010).

A embriogénese não zigótica também ocorre em gimnospermas havendo a formação de embriões por clivagem. Aqui ocorre a formação de embriões supranumerários, por várias divisões do zigoto (Durzan *et al.*, 1994).

#### **1.4. Embriogénese somática**

A embriogénese somática é o processo onde há formação de embriões a partir de células somáticas já diferenciadas (Zimmerman, 1993). Todas as células somáticas possuem a informação genética necessária para dar origem a uma planta funcional (Thorpe, 1995). Isso ocorre devido à expressão de totipotência que as células vegetais adquirem (Komamine *et al.*, 1992). Para que a totipotência se possa exprimir tem que ocorrer desdiferenciação das células e posterior rediferenciação ou reprogramação, para a formação de células embriogénicas (Rose *et al.*, 2010). A obtenção de embriões somáticos, que mantenham o genoma das plantas-mãe e conseqüentemente as características julgadas de interesse é uma das ferramentas actuais mais importantes da Biotecnologia Vegetal. A obtenção de embriões somáticos pode ocorrer por duas vias, uma directa e outra indirecta em que há a formação de um calo antes da obtenção dos embriões (Sharp *et al.*, 1980), sendo que a maioria dos casos descritos ocorre a embriogénese indirecta, com a formação de calo (Canhoto, 2010). Há ainda a embriogénese cíclica ou secundária, em que é possível a obtenção de embriões somáticos durante vários ciclos de embriogénese (Thorpe, 1995). No caso de a embriogénese ser directa as células que sofrem o processo de desdiferenciação são designadas de PEDC (“pre-embryogenic determined cells”), e só necessitam de um estímulo para que se formem embriões. Por outro lado, na via indirecta, as células são

designadas de IEDC - “induced embryogenic determined cells” (George *et al.*, 2008). Nestas ocorrem vários ciclos mitóticos induzidos por uma hormona e subsequente formação de um calo embriogénico antes da formação de embriões (Figueroa *et al.*, 2006).

O primeiro passo para a obtenção de embriões somáticos é a fase de indução. A indução de embriões somáticos é condicionada por várias variáveis como o tipo de explante, o genótipo da planta mãe e as condições de cultura (Rose *et al.*, 2010). A indução é feita através de um stresse provocado no explante. Esse stresse pode ser um simples corte ou maceração do tecido (Dhanalakshmi e Lakshmanan, 1992) mas, por norma, o stresse é normalmente provocado pela manipulação do meio de cultura, em virtude da inclusão de reguladores de crescimento vegetal (PGS), geralmente auxinas, ou pela inclusão de uma fonte de carbono em concentrações elevadas (von Arnold, 2008; Yang e Zhang, 2010). De referir, que o próprio isolamento do explante e a sua inoculação num meio sintético é, só por si, uma situação de stresse que leva por vezes à proliferação celular e ulterior formação de embriões.

São várias as auxinas que podem ser utilizadas para a indução da embriogénese somática. A mais utilizada é o 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético), mas outras, como o NAA (ácido  $\alpha$ -naftaleno acético), IBA (ácido indol-3-butírico), IAA (ácido indol-3-acético), Picloram e dicamba são também de utilização corrente (Jiménez e Thomas, 2005). Para a escolha de explante devem ter-se em consideração vários factores como o estado fisiológico da planta e a idade do explante, visto que explantes mais jovens respondem melhor do que explantes mais diferenciados (Gaj, 2004). O explante pode ser de origem variável folhas, pétalas, sépalas, caules, cotilédones, hipocótilo, raízes, anteras ou embriões zigóticos. A indução a partir de tecidos embrionários é usada com frequência, mas apresenta como limitação o facto dos embriões obtidos não reflectirem o genótipo da planta mãe mas sim do embrião ou dos tecidos embrionários utilizados. Por sua vez, a indução a partir de material obtido a partir de plantas adultas e de características conhecidas é mais complexa, dada a recalcitrância observada (Canhoto, 2010). Para contornar esta dificuldade realiza-se muitas vezes a indução a partir de rebentos caulinares mantidos *in vitro*, podendo utilizar-se como explantes folhas jovens (Correia *et al.*, 2011).

O genótipo da planta também é um factor importante na indução de embriogénese somática, visto que numa mesma espécie a indução de embriogénese somática ocorre com maior facilidade em alguns cultivares do que noutros, (Krikorian, 2000).

A origem dos embriões somáticos pode ser unicelular (Street & Withers, 1974; Haccius, 1977), mas em muitas espécies a origem é multicelular (Williams & Maheswaran, 1986). Pode ainda acontecer que, numa mesma espécie, seja possível a formação de embriões somáticos com origem unicelular e multicelular (Canhoto & Cruz, 1996).

As fases de desenvolvimento dos embriões somáticos são semelhantes às observadas durante a embriogénese zigótica, sendo designadas por globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (Capron *et al.*, 2009). Os embriões somáticos possuem também polaridade e os mesmos órgãos dos embriões zigóticos (Arnold *et al.*, 2002). Uma diferença entre os embriões somáticos e zigóticos ocorre nas primeiras divisões celulares, pois nos embriões somáticos essas divisões podem seguir padrões diferentes daqueles observados nos embriões zigóticos da mesma espécie (Fehér, 2005). Estas diferenças são provavelmente uma das causas para o elevado número de embriões anómalos que se formam em muitas espécies (Canhoto, 2010), embora outros factores possam também contribuir como a fraca deposição de compostos de reserva (Correia *et al.*, 2012) ou variações cromossómicas (von Arnold, 2008).

Durante o desenvolvimento dos embriões zigóticos forma-se uma estrutura efémera, designada suspensor, que permite a canalização de nutrientes da planta mãe para o embrião e a fixação ao saco embrionário (Capron *et al.*, 2009). Nos embriões somáticos esta estrutura pode ou não ocorrer, mas uma estrutura análoga ao suspensor parece formar-se quando o embrião somático tem origem unicelular (Correia & Canhoto, 2010). Quando a origem do embrião é multicelular o embrião nas fases mais avançadas apresenta um maior número de anomalias, não apresentando muitas vezes suspensor (Canhoto, 2010).

Após a fase de morfogénese, em que se formam os tecidos e órgãos embrionários, os embriões entram numa fase de maturação, em que o conteúdo em água se reduz e se acumulam substâncias de reserva (Raghavan, 2006). Nos embriões somáticos acontece uma fase semelhante em que também se acumulam substâncias de



reserva. No entanto, a dessecação é problemática, uma vez que os embriões são formados e mantidos num meio bastante hidratado (Rose *et al.*, 2010). Estudos têm revelado que os embriões somáticos podem apresentar impressionantes semelhanças ou então marcadas diferenças com os embriões zigóticos no que às substâncias de reserva diz respeito (Thorpe, 1995). Tratamentos com ABA (ácido abscísico) são utilizados para promover a acumulação de substâncias de reserva, para uma melhor maturação mas as condições de luz podem também ser importantes na aquisição de uma maturação mais eficaz (Correia *et al.*, 2012).

A formação dos embriões somáticos só é interessante em termos de clonagem se eles puderem originar plantas. Esta etapa apresenta analogias com a germinação dos embriões zigóticos (Thorpe, 1995). Contudo, é muitas vezes designada por conversão, para indicar que os dois processos apresentam algumas diferenças que têm a ver com o facto dos embriões somáticos apresentarem, muitas vezes, anomalias que interferem com uma germinação normal (Stuart & Strickland, 1984; Canhoto, 2010).

Na fase de germinação de embriões ocorrem muitas perdas por vários factores, entre os quais anomalias genéticas. Os embriões com anomalias podem não germinar, germinar com alguma alteração morfológica (embriões fundidos, cotilédones fundidos) ou apresentar anomalias somaclonais em que apesar de serem morfológicamente normais apresentam anomalias funcionais ou genéticas que impedem a sua germinação (Canhoto, 2010).

Tendo em consideração toda esta informação, parece poder concluir-se que a indução de embriogénese somática é uma excelente ferramenta para estudos moleculares, citológicos e fisiológicos sobre a embriogénese dada a facilidade de obtenção dos embriões, por oposição ao que se verifica com a embriogénese zigótica em que o embrião se desenvolve rodeado por vários tecidos (Fehér *et al.*, 2003; Figueroa *et al.*, 2006). Também a sua importância no melhoramento de plantas é cada vez mais reconhecida dada a possibilidade de ser utilizada na clonagem, na propagação de híbridos e na transformação genética (Stassola & Yeung, 2003).

### 1.5. Família Lauraceae

A família Lauraceae é constituída por 49 géneros com cerca de 2500 espécies, localizadas maioritariamente nas regiões tropicais ou sub-tropicais e com algumas espécies situadas em regiões temperadas, (Werff & Richter, 1996). Em termos filogenéticos é considerada uma família primitiva, pertencendo à divisão Magnoliophyta, tendo características anatómicas semelhantes a outras famílias também consideradas menos evoluídas como Calycanthaceae, Idiospermaceae e Hernandiaceae (Cronquist, 1988) Os seus antepassados tiveram grande radiação adaptativa por altura do cretácico, ocupando antigas massas continentais como a Laurásia e o Gondwana, sendo, por isso, encontrado exemplares desta família na América do Sul, Europa, África, Ásia e América (Silva, 2007).

As espécies da família Lauraceae caracterizam-se por serem árvores ou arbustos, com folhas geralmente persistentes e inteiras. Podem ser dióicas ou com flores hermafroditas e os frutos são bagas drupáceas (Franco, 1971).

Incluem-se nesta família várias espécies de interesse económico como *Cinnamomum camphora*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Laurus nobilis* ou *Persea americana* (Canhoto *et al.*, 1999; Litz *et al.*, 2007). Um dos interesses económicos é a madeira de boa qualidade das espécies deste grupo, mas cada espécie tem, para além da madeira, outras aplicações. Assim, destacam-se as folhas do loureiro (*Laurus nobilis*) utilizadas na culinária como tempero (Canhoto *et al.*, 1999), os abacates (*Persea americana*) utilizados na alimentação e cosmética (Litz *et al.*, 2007), a canela (*Cinnamomum zeylanicum*), uma especiaria, e a cânfora utilizada como incenso (Shi *et al.*, 2010). Os óleos essenciais são muito estudados nesta família, havendo células secretoras nas folhas, lenho, casca (Metcalf, 1987; Barros *et al.*, 1997a) e frutos (Schroeder, 1989). A madeira também é utilizada para o fabrico de papel, principalmente a de várias espécies do género *Ocotea*, (Marques, 2001).

Algumas espécies desta família estão sujeitas a pressões ambientais de vários tipos, situações que em alguns casos podem ser atenuadas pela aplicação da biotecnologia. Por exemplo a espécie, *Ocotea odorifera*, tem sofrido uma redução considerável (Viana *et al.*, 1999), podendo ser recuperada através de programas de conservação *in vitro*. Uma situação completamente diferente verifica-se com *Cinnamomum camphora*, que tem um comportamento invasivo que poderá, através de

transformação genética, ser alterado para produzir menos sementes (Shi *et al.*, 2010). Outras espécies, como a *Ocotea porosa*, têm dificuldade em se propagar naturalmente (Pelegriani *et al.*, 2011), podendo a utilização de métodos de micropropagação ultrapassar esta limitação.

### 1.5.1 *Laurus nobilis* e *Laurus azorica*

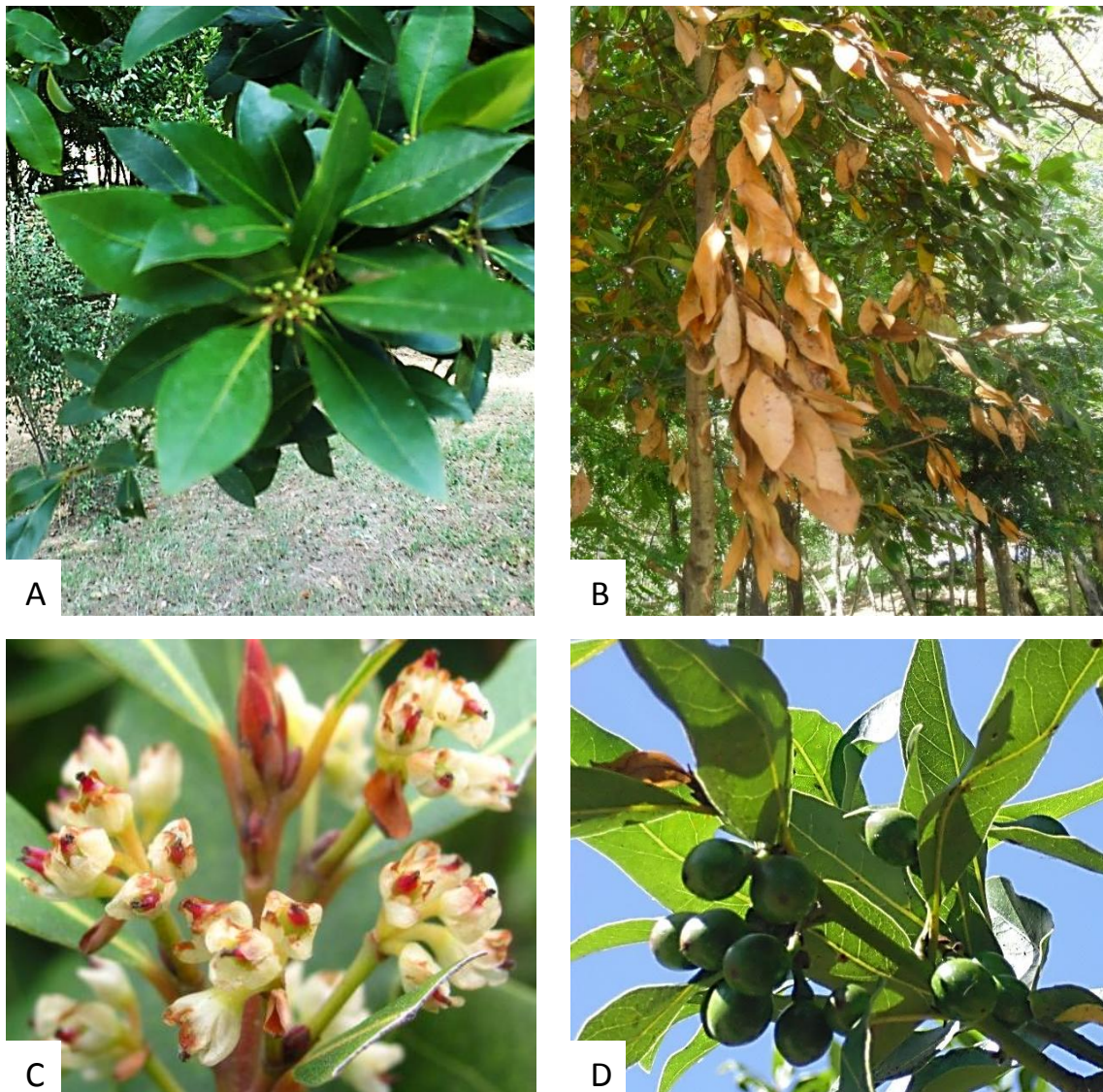
*Laurus nobilis* L. (Fig. 1) e *Laurus azorica* (Seub.) Franco são duas espécies lenhosas pertencentes à família Lauraceae. *Laurus nobilis* distribui-se na bacia do Mediterrâneo, sendo vulgarmente encontrado em Portugal (Tutin, 1964). A espécie é vulgarmente conhecida por várias designações, como loureiro, loureiro-dos-poetas ou louro, entre outros (Rocha,1996). No caso do *Laurus azorica* a sua distribuição está restringida ao arquipélago dos Açores, onde é vulgarmente conhecido como loureiro, loureiro-dos-açores, louro-bravo ou louro-macho (Rocha, 1996).



**Figura 1:** Árvore de Loureiro situada no jardim da Sereia, Coimbra.

Ambas as espécies são dióicas, de folha persistente atingindo alturas que podem chegar aos 20 metros, (Franco, 1971). O seu número de cromossomas é  $2n = 42$  (Hegi, 1958; Tutin, 1964). As folhas são verde-escuras e glabras, sub-elípticas ou lanceoladas, com bastante odor (Fig. 2A e B) (Franco, 1971; Sampaio, 1988). Este provém do óleo de loureiro que é composto por vários compostos tais como cineol, geraniol e terpenos

(Bonnier, 1957). As flores masculinas são amareladas, com estames biglandulosos e apresentam um gineceu rudimentar (Franco, 1971; Lanzara *et al.*, 1978; Polunin, 1982). As flores femininas são pequenas e possuem 2-3 estaminódios (Fig. 2C) (Franco, 1971). Os frutos são drupas, ovóides e negros (Fig. 2D) (Sampaio, 1988), sendo maiores em *Laurus azorica* (até 2cm) que em *Laurus nobilis* - 1-1,5 cm (Franco, 1971). Outra das diferenças encontra-se nas folhas, onde em *Laurus azorica* os renovos são robustos e as folhas geralmente com uma maior dimensão (Franco, 1971). As sementes possuem bastante amido (22%) e ácido láurico (Bonnier, 1957), sendo exospérmicas (Coutinho, 1974). O embrião preenche totalmente a semente possuindo dois grandes cotilédones carnudos e a radícula próxima do hilo (Canhoto *et al.*, 1999).



**Figura 2:** Aspectos morfológicos de loureiro. (A) Folhas de loureiro. (B) folhas secas de *Laurus nobilis*, muito utilizadas na culinária. (C). Flores femininas de loureiro. (D). Frutos imaturos.

Ambas as espécies são usadas como ornamentais, ou na medicina tradicional (Bonnier, 1957). *L. nobilis* foi em tempos um símbolo de glória, sendo utilizado em coroas para distinguir os melhores atletas e poetas (Lanzara *et al.*, 1978). Actualmente o grande uso do loureiro é na culinária como tempero na cozinha mediterrânica (Bremness, 1990). Já a espécie *L. azorica* não pode ser usado para esse fim devido à elevada toxicidade das suas folhas, (Silva, 2007). Esta espécie tem especial interesse por ser endógena do arquipélago dos Açores e ter sido catalogado no livro vermelho das espécies ameaçadas (Silva, 2007).

Em ambos os casos a propagação por sementes ou multiplicação vegetativa é reduzida (Lanzana *et al.*, 1978). Deste modo, a micropropagação através da embriogénese somática poderá ser interessante para multiplicação destas espécies.

### 1.5.2. Embriogénese somática em Lauraceae

A embriogénese somática já foi conseguida em várias espécies pertencentes à família Lauraceae entre as quais, *Cinnamomum camphora* (Shi *et al.*, 2010), *Laurus nobilis* (Canhoto *et al.*, 1999), *Ocotea catharinensis* (Moura-Costa *et al.*, 1993), *Persea americana* (Pliego-Alfaro & Murashige, 1988) e *Sassafras randaiense* (Chen & Wang, 1985). Nos casos descritos a embriogénese somática foi conseguida sempre através da utilização de embriões zigóticos como explante. O número de embriões somáticos formados por explante pode ser variável e, no caso do loureiro, podem formar-se desde algumas unidades até mais de uma centena (Canhoto *et al.*, 1999). Os embriões somáticos podem apresentar uma estrutura análoga ao suspensor (Chen & Wang, 1985). A origem dos embriões somáticos no caso do loureiro parece ser unicelular (Canhoto *et al.*, 1999), o mesmo acontece em outras espécies como por exemplo *Persea americana* (Mooney & van Staden, 1987).

Para além da embriogénese somática primária foi também conseguida embriogénese somática secundária ou repetitiva em várias espécies como *Cinnamomum camphora* (Shi *et al.*, 2010), *Laurus nobilis* (Canhoto *et al.*, 1999), *Ocotea catharinensis* (Moser *et al.*, 2004) e *Sassafras randaiense* (Chen & Wang, 1985), o que permite a obtenção de embriões somáticos durante vários ciclos.

A maturação dos embriões somáticos foi conseguida em *Cinnamomum pauciflora* (Kong *et al.*, 2009), *Laurus nobilis* (Canhoto *et al.*, 1999), tendo os embriões somáticos maduros muita similaridade com os embriões zigóticos. A taxa de maturação foi aumentada com sucesso em *Persea americana* com alterações do conteúdo em água do meio de cultura (Márquez-Martín *et al.*, 2011). A germinação e conversão de embriões somáticos foi conseguida em *Cinnamomum pauciflora* (Kong *et al.*, 2009) e em *Ocotea odorifera* (Santa-Catarina *et al.*, 2001). No caso do *Laurus nobilis* a conversão só foi conseguida com taxas muito reduzidas (Canhoto *et al.*, 1999).

Foram também efectuados estudos de transformação genética utilizando *Agrobacterium tumefaciens* para transformar culturas embriogénicas no abacateiro, onde se obtiveram embriões somáticos transformados geneticamente, com a incorporação de dois genes (Cruz-Hernández *et al.*, 1998). Também no abacateiro foi conseguido, através de culturas embriogénicas obtidas a partir de embriões zigóticos, o isolamento de protoplastos, dos quais se obtiveram embriões somáticos. A germinação destes em plântulas foi conseguida, embora com uma baixa percentagem (Witjaksono, *et al.*, 1998).

À semelhança do que se verifica noutras espécies, também as anomalias nos embriões somáticos são frequentes em Lauráceas, podendo citar-se como exemplos *Laurus nobilis* (Canhoto *et al.*, 1999), *Persea americana* (Mooney e van Standen, 1987) e *Sassafras randaiense* (Chen e Wang, 1985).

Para além da embriogénese somática, a cultura de meristemas também foi conseguida em algumas espécies como em *Cinnamomum camphora* (Nirmal Babu *et al.*, 2003), *Laurus nobilis* (Souayah *et al.*, 2002), *Ocotea bullata* (Kowalski & van Staden, 2001) e *Ocotea porosa* (Pelegri *et al.*, 2011).

## **1.6. Enquadramento do trabalho**

O presente trabalho enquadra-se numa das linhas de investigação em curso no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Ecologia Funcional do Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra. Neste âmbito, têm sido estudadas várias espécies de plantas com vista ao seu potencial de formação de embriões somáticos. Algumas dessas espécies possuem um interesse económico óbvio,

como feijoa, tamarilho ou medronheiro, oliveira e eucalipto enquanto outras são mais interessantes do ponto de vista ecológico ou da conservação, como acontece com as duas espécies de loureiro que são objecto deste estudo.

### **1.7. Objectivos**

Este trabalho teve como principal objectivo estabelecer novas culturas embriogénicas de *L. azorica* e *L. nobilis* e estudar o seu comportamento em cultura, como o objectivo de obter a sua propagação e manutenção bem como a conversão em embriões somáticos. De forma a obter uma melhor caracterização das culturas foram realizados ensaios citológicos e histológicos. A maior parte dos ensaios foi realizada com embriões zigóticos maduros, mas fizeram-se também ensaios com outros tipos de explantes com o objectivo de testar o seu potencial morfogénico. Os resultados obtidos são mais uma contribuição para o estudo da embriogénese somática em lenhosas.

## 2. Material e Métodos

---



## 2.1. Estabelecimento de culturas

### 2.1.1. Material vegetal

O material necessário de *Laurus nobilis* para o estabelecimento de culturas foi retirado de uma árvore feminina adulta. Os ramos jovens foram recolhidos numa árvore que se encontra no Jardim Botânico, da Universidade de Coimbra. Os ramos jovens de *Laurus azorica* foram enviados da ilha de São Miguel, arquipélago dos Açores.

### 2.1.2. Meio de cultura

O meio utilizado neste trabalho para estabelecimento das culturas a partir de material adulto foi o meio MS (Murashige & Skoog, 1962, Tabela I), com sacarose a 3% e 0,2 mg/L da citocinina benziladenina (BA). O pH foi ajustado para 5,6 a 5,8 e no final adicionou-se agar 6 g/L para solidificar o meio. O meio foi autoclavado a 120 °C, durante 20 minutos, para as condições de assepsia serem asseguradas.

**Tabela I:** Composição do meio MS (Murashige & Skoog, 1962)

mg/L	
<b>Macronutrientes</b>	
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	440
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
KNO <sub>3</sub>	1900
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	370
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
<b>Micronutrientes</b>	
CoCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	0.025
CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	0.025
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
KI	0.83
MnSO <sub>4</sub> •4H <sub>2</sub> O	22.3
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	0.25
ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	8.6
<b>Fonte de ferro (FeEDTA)</b>	
FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	27.8
Na <sub>2</sub> EDTA•2H <sub>2</sub> O	37.3
<b>Compostos orgânicos</b>	
Ácido nicotínico	0.5
Glicina	2
Piridoxina - HCl (vit. B6)	0.5
Tiamina - HCl (vit. B1)	0.1
<b>Mioinositol</b>	100

### 2.1.3. Preparação do material vegetal

As gemas de *Laurus nobilis* e *Laurus azorica* foram estabelecidas de acordo com um protocolo de estabelecimento de gemas de *Cyphomandra betacea* (Correia *et al.*, 2011). Os ramos jovens foram colhidos com cerca de 30 cm (Figs. 3A e B), foram lavados em água corrente, sendo depois postos num recipiente com alguma água e tapados por um saco perfurado para ocorrerem as trocas gasosas. Os ramos foram borrifados com fungicida (benlato 6% p/v) e a água mudada de dois em dois dias, durante duas a três semanas, tendo o material ficado à temperatura ambiente durante esse período.

Depois do abrolhamento e quando as gemas atingiram o tamanho adequado (entre 1-2 cm) (Figs. 3A e B), procedeu-se à sua descontaminação. As gemas foram cortadas dos ramos e foram lavadas em água esterilizada com 2-3 gotas de detergente (Tween 20). Em seguida foram colocadas cerca de 30s em álcool 70% (v/v) e ulteriormente colocadas numa solução de hipoclorito de cálcio a 7% (p/v), com 2-3 gotas de Tween 20, durante 10 minutos sob agitação. Após este tratamento, e já na câmara de fluxo laminar, as gemas foram lavadas por três lavagens com água bidestilada, para remover o excesso de hipoclorito.



**Figura 3:** Ramos utilizados para a cultura de gemas de loureiro. (A) *L. nobilis* a seta indica o abrolhamento das gemas. (B) Abrolhamento de *L. azorica* indicado pela seta.

#### 2.1.4. Cultura das gemas

No cultivo de gemas para manter as condições de assepsia as pinças e bisturis foram passados por álcool 95% (v/v) e passados várias vezes na chama para sua esterilização, sendo todo o trabalho efectuado na câmara de fluxo laminar. Às gemas esterilizadas foram retiradas as folhas de maiores dimensões, ficando o mínimo de material possível à volta do meristema, foi também retirado o máximo de material lenhoso do ramo. As gemas foram colocadas nos tubos de ensaio, sendo anotado o meio

utilizado e a data em que a cultura foi efectuada. Estes ficaram em cultura numa estufa a 25 °C, com um fotoperíodo de 16h luz por dia e as restantes horas do dia no escuro.

Os ramos a partir dos quais as gemas foram obtidas permaneceram mais tempo nas condições anteriormente descritas para que mais gemas se pudessem desenvolver. O procedimento foi repetido mais uma vez, tendo o material sido sempre descontaminado com benlato e a água mudada de dois em dois dias, até as novas gemas atingirem um tamanho superior (2-3 cm), e assim na cultura colocar o mínimo possível de partes lenhosas, para tentar evitar as contaminações endógenas.

#### 2.1.5. Cultura de segmentos nodais de plântulas

Em alguns dos explantes colocados em meios de indução de embriogénese somática, o embrião germinou e deu origem a plântulas que apresentavam um forte crescimento, com a formação de vários fitómeros em que as folhas apresentavam dimensões reduzidas. Nestas plântulas, os nós foram isolados e cultivados *in vitro*, com vista à proliferação dos meristemas axilares.

Os segmentos nodais assim obtidos, foram isolados e colocados em meios de cultura MS contendo 0,2 e 0,5 mg/L de BA e meio MS com 1 mg/L da auxina 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), juntamente com 0,2 mg/L de cinetina. Em alguns casos, as plântulas em crescimento contornavam as rolhas dos tubos onde estavam e cresciam já fora destes, nessas situações, procedeu-se a uma esterilização dos segmentos nodais. Esta esterilização foi mais ligeira que a descrita anteriormente para o abrolhamento tendo sido efectuada com hipoclorito de cálcio a 5% (p/v), durante 10 minutos sob agitação e duas gotas de detergente Tween 20, seguido de três lavagens com água bi-destilada na câmara de fluxo.

O material foi colocado numa estufa a 25 °C, sob um fotoperíodo de 16h luz por dia.

## 2.2. Ensaio de diferenciação de embriões somáticos a partir de tecido embriogénico

### 2.2.1. Material utilizado

Calos embriogénicos (tecido embriogénico) mantidos em cultura desde 1999 (Fig. 4) e induzidos a partir de cotilédones de *L. nobilis* (Canhoto *et al*, 1999) foram utilizados para verificar o seu potencial de evoluir em embriões somáticos. Este material tem sido mantido (subculturas realizadas mensalmente) em meio MS contendo a auxina 2,4-D, na concentração de 1 mg/L e 3% (p/v) de sacarose 3%, meio designado neste trabalho por LN1.



**Figura 4:** Tecido embriogénico mantido desde 1999, em meio MS com 1 mg/L 2,4-D.

### 2.2.2. Meios de cultura

Para promover o desenvolvimento das massas proembriogénicas em embriões somáticos foram testados vários os meios de cultura.

Os meios testados tinham sempre na sua composição sacarose a 3%, agar 6 g/L para gelificar os meios e o pH ajustado a 5,6 - 5,8, sendo no fim feita a autoclavagem a 120°C durante 20 min.

Os primeiros meios testados na diferenciação de embriões somáticos foram meios MS com a adição de várias concentrações (0,5; 1 e 2 mg/L) de ácido giberélico ( $GA_3$ ), juntamente com 0,5 mg/L de benziladenina (BA). Num outro ensaio foi testado o ácido abscísico (ABA) nas concentrações de 2mg/L e 4mg/L (Tabela II). Outros estudos foram efectuados a partir do material resultante dos meios  $LN_{A1}$  e  $LN_{A2}$ . Os calos embriogénicos resultantes dos tratamentos com ABA foram repicados para meios com  $GA_3$ : o material  $LN_{A1}$  e  $LN_{A2}$  foi mudado para meio MS com 5 e 10 mg/L de  $GA_3$ . Para controlo repicou-se também material LN1 para os mesmos meios anteriormente descritos. Passados cerca de 1 mês e meio, todos estes meios foram mudados para meio MS sem hormonas e para meio MS sem hormonas com adição de carvão activado a 1,5%.

Num outro ensaio utilizaram-se dois inibidores das hormonas vegetais. Um deles foi o TIBA (2,3,5-triidobenzoic acid), um inibidor do transporte polar de auxinas, tendo-se utilizado na concentração de 10 mg/L em meio MS. O outro foi a fluoridona (1-metil-3-fenil-5-[3-(trifluorometil)-fenil]-4-(1H)-piridinona), um inibidor da via de síntese dos carotenóides e do ABA (Sprecher *et al.*,1998), tendo-se também utilizado como meio base o meio MS com a fluoridona na concentração de 10 mg/L (Tabela II). Os calos embriogénicos permaneceram neste meio durante 5 semanas, após o que foram transferidos para meio MS sem hormonas.

Os calos embriogénicos mantidos em meio LN1 foram também transferidos para meio MS com 3% de sacarose e 1,5% de carvão activado e tratados pelo frio (4°C), por períodos de 1 ou 2 semanas, procedendo-se à sua transferência para a estufa, no escuro a 24°C (Tabela II).

Nos ensaios LNT, LNf e nos ensaios com frio para além de se verificar a capacidade do tecido embriogénico evoluísse para embriões foi testado o efeito sobre o crescimento do tecido. Para isso foi pesado a quantidade de calo repicado, para se ter uma ideia da quantidade de material repicado. Assim, foram pesadas 10 amostras de tecido, com o cuidado de tirar mais ou menos a mesma quantidade de material tendo-se efectuado a média destas amostras. Passado 1 mês fotografaram-se os calos formados para verificar o crescimento obtido.

**Tabela II:** Meios utilizados na cultura de material LN1 para promover o desenvolvimento de embriões somáticos.

Meios	Composição dos Meios
LN <sub>GB1</sub>	MS + 0,5 mg/L GA <sub>3</sub> + 0,5 mg/L BA
LN <sub>GB2</sub>	MS + 1 mg/L GA <sub>3</sub> + 0,5 mg/L BA
LN <sub>GB3</sub>	MS + 2 mg/L GA <sub>3</sub> + 0,5 mg/L BA
LN <sub>A1</sub>	MS + 2 mg/L ABA
LN <sub>A2</sub>	MS + 4 mg/L ABA
LN <sub>t</sub>	MS + 10 mg/L TIBA
LN <sub>f</sub>	MS + 10 mg/L Fluoridona
LN 1frio	MS (1 semana frio)
LN 2frio	MS (2 semanas frio)

De referir que uma parte do tecido embriogénico foi sempre utilizado para manter e multiplicar este tipo de material vegetal para que houvesse sempre tecido disponível para os ensaios.

A ocorrência de desenvolvimento dos embriões, em cada um dos ensaios, era observada passados cerca de 1 mês após as repicagens, onde poderia, caso necessário, o material permanecer mais tempo para aumentar o stresse nos calos e dar mais tempo para que o desenvolvimento ocorresse.

### 2.2.3. Estudos citológicos

Tecido embriogénico proveniente de diferentes tratamentos foi analisado ao microscópio para determinar a evolução das culturas. Com esse objectivo, pequenas partes dos calos foram removidos do meio, colocados numa lâmina de microscópio com algumas gotas de carmim acético e observados num microscópio óptico Nikon Digital Eclipse E400 e fotografados sempre que julgado conveniente utilizando uma câmara Nikon Digital Sight DS-U1, com o software Act-2U.

### 2.3. Estudos histológicos

Para a realização de cortes semi-finos para estudos histológicos, utilizou-se material previamente impregnado em resina (Spurr, 1969), de acordo com o procedimento descrito por Canhoto *et al.* (1999). Em resumo, pequenas porções de calos embriogénicos em diferentes fases de desenvolvimento e secções de cotilédones de embriões (somáticos e zigóticos) maduros foram fixadas em 2,5% de gluteraldeído, com 0.1M de tampão fosfato. Após lavagem no mesmo tampão, procedeu-se a uma pós-fixação em 1% de tetróxido de ósmio durante 1 – 1,5h à temperatura ambiente. De seguida efectuaram-se três lavagens no mesmo tampão e os exemplares foram desidratados num gradiente de etanol (20 – 100%) e embebidos em resina. A polimerização ocorreu durante 24h numa estufa a 60°C.

Os cortes semi-finos (1-2  $\mu$ ) foram efectuados com facas de vidro num micrótomo. Os cortes foram colocados numa lâmina com uma gota de acetona 20% e ficaram numa estufa 60°C, durante cerca de 24h. Em seguida foram corados com uma solução de azul de toluidina (solução aquosa de azul de toluidina a 1%, azur II 1% e borato de sódio 1%) (Hall, 1978), durante 30 min, tendo ficado durante esse tempo às escuras e à temperatura ambiente, sendo depois realizadas duas lavagens com água destilada após o que foram deixados no fim ficaram a secar durante cerca de 24h numa estufa a 60°C.

Os cortes foram observados num microscópio óptico Nikon Digital Eclipse E400 e as imagens captadas por uma máquina fotográfica Nikon Digital Sight DS-U1, utilizando o software Act-2U.

### 2.4. Indução de embriogénese somática em cotilédones de *L. nobilis* e *L. azorica*

#### 2.4.1. Material utilizado

Para este estudo utilizaram-se frutos de *L. nobilis* colhidos em várias árvores do Jardim da Sereia, Coimbra. Os frutos de *L. azorica* foram enviados da ilha de São Miguel, arquipélago dos Açores. Os frutos das duas espécies de Loureiro foram colhidos quando apresentavam uma tonalidade escura indicadora da sua maturação.



## 2.4.2. Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados para a indução de embriogénese somática em *L. nobilis* e *L. azorica* estão discriminados na Tabela III. Foram utilizadas duas auxinas, Picloram (4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid) e 2,4-D, sendo o meio base o meio MS com sacarose a 3%, agar 6 g/L como agente gelificante, o pH ajustado para valores entre 5,6 - 5,8 e autoclavagem a 120°C durante 20 min.

**Tabela III:** Meios utilizados na indução de embriogénese somática em cotilédones de *L. nobilis* e *L. azorica*.

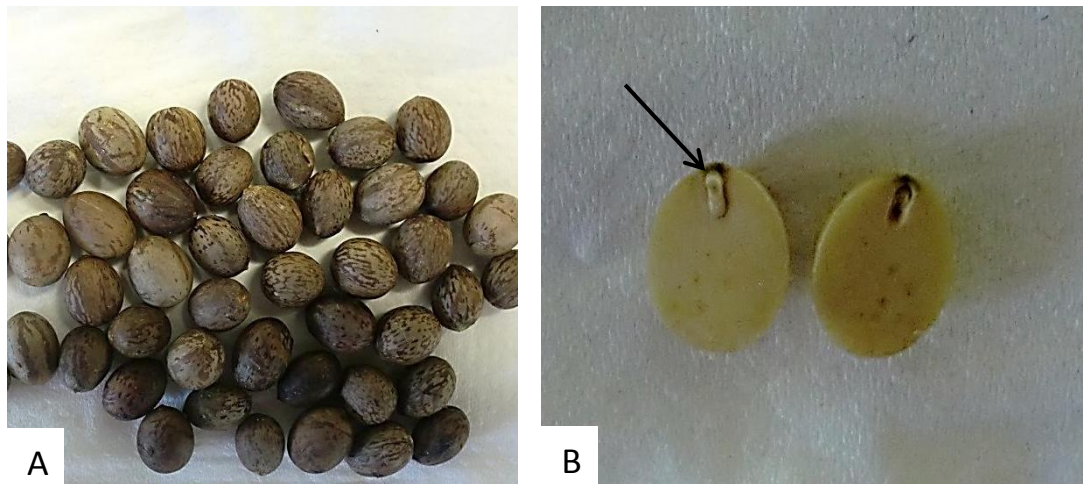
Meio	Hormona/Concentração
MS-D1	1 mg/L 2,4-D
MS-D2	2mg/L 2,4-D
MS-D5	5mg/L 2,4-D
MS-P1	1mg/L Picloram
MS-P2	2mg/L Picloram
MS-P5	5mg/L Picloram

## 2.4.3. Preparação dos frutos

Os frutos foram lavados em água corrente e de seguida retirou-se a parte carnuda do pericarpo, ficando apenas a semente (Fig. 5A). Este material vegetal foi imediatamente utilizado para a obtenção de cotilédones e indução de embriogénese somática ou foi seco e guardado em caixas para utilização ulterior.

Para a cultura dos cotilédones foi efectuada uma esterilização prévia das sementes. Estas foram primeiro lavadas em água bidestilada com 2-3 gotas de Tween 20 sob agitação durante 1 min. Após lavagem em água esterilizada as sementes foram transferidas para uma solução de hipoclorito de cálcio 7% (p/v) com 2 gotas de Tween 20, com agitação, durante 10 minutos. Procedeu-se em seguida a três lavagens com água esterilizada de forma a remover o excesso de hipoclorito. Na câmara de fluxo laminar procedeu-se ao isolamento dos embriões e separação dos cotilédones (Fig. 5B). Em alguns ensaios os cotilédones foram cultivados com a face interna em contacto com o meio enquanto noutros se posicionaram de forma inversa. Cada cotilédone foi colocado num tubo de ensaio contendo o meio de cultura tendo-se assinalado quais os cotilédones

cultivados com o eixo embrionário associado. As culturas foram colocadas numa estufa, a 25°C, em condições de escuro.



**Figura 5:** Sementes (A) e cotilédones (B) de *Laurus nobilis* (a seta indica o eixo embrionário).

#### 2.4.4. Obtenção de embriogénese somática secundária

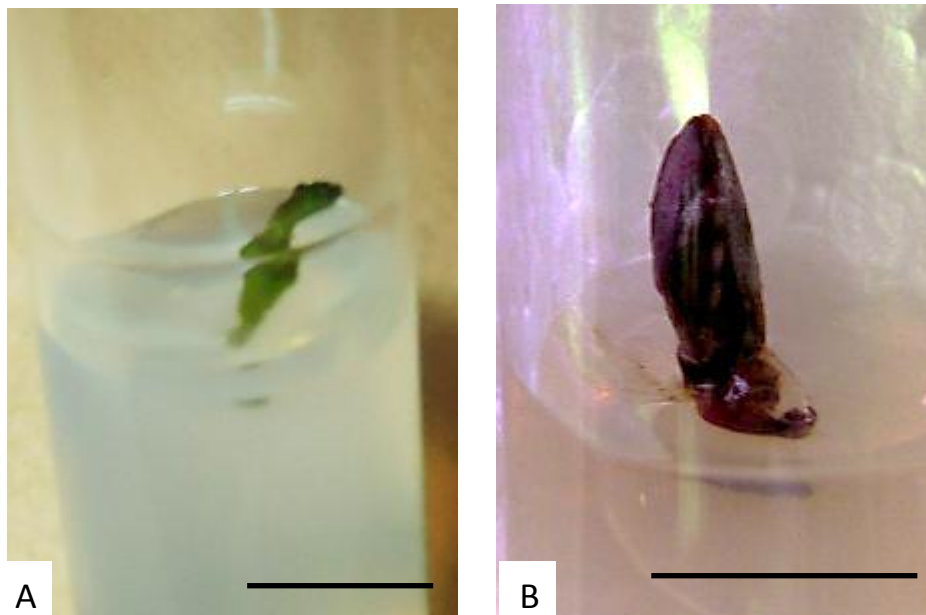
Os embriões somáticos primários obtidos nos meios indicados na secção 2.3.2 foram cultivados em meio MS conforme descrito anteriormente,. Os embriões somáticos foram retirados com cuidado para não se danificarem e colocados no novo meio. As culturas foram mantidas na estufa a 25°C, no escuro.

## 3. Resultados

---

### 3.1. Estabelecimento de culturas

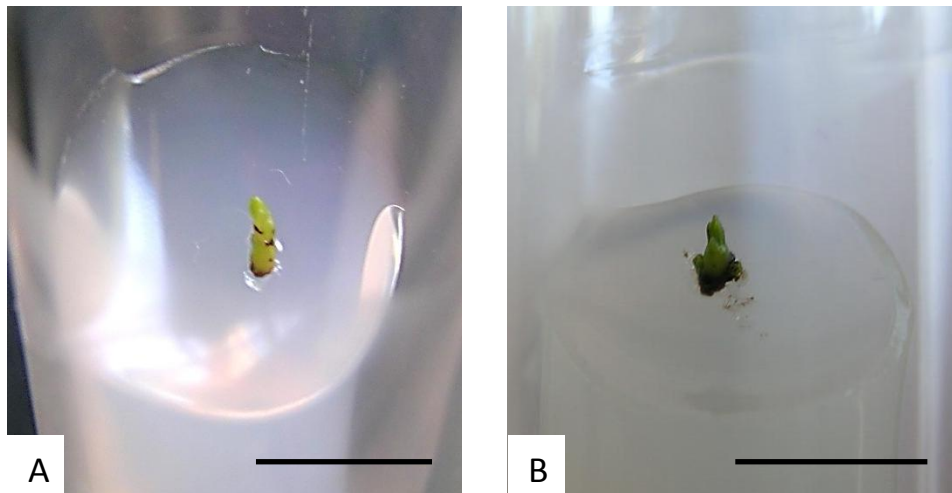
A aplicação do protocolo descrito nos materiais e métodos para tamarilho e aplicado no loureiro, não teve os resultados esperados, ou seja não se verificou a proliferação dos meristemas. Dos 39 explantes cultivados, verificou-se que 33 apresentaram contaminações após poucos dias de cultura enquanto nos restantes, embora não tenha ocorrido contaminação, não foi detectado qualquer crescimento ou este ocorreu apenas de forma limitada com a formação de uma ou duas folhas (Fig. 6A). Estes explantes em que ocorreu algum desenvolvimento foram subcultivados no mesmo meio, mas as gemas não se desenvolveram e acabaram por ficar necróticas (Fig. 6B).



**Figura 6:** Aspectos da cultura de explantes provenientes do abrolhamento de ramos lenhificados. (A) Gema caulinar de loureiro em que não ocorreu desenvolvimento. (B) Gema caulinar de loureiro necrosada após 50 dias de cultura. As barras correspondem a 1 cm.

Nos ensaios de cultura dos segmentos nodais ou dos ápices caulinares provenientes da germinação dos embriões zigóticos, também não se verificou a proliferação de meristemas axilares (Fig. 7A). Em alguns casos, em que os segmentos nodais foram cultivados não de forma vertical, mas na horizontal, com toda a superfície em contacto com o meio, verificou-se, num reduzido número de explantes, algum

desenvolvimento, mas rapidamente ocorria desdiferenciação e formação de pequenos calos na base (Fig. 7B).



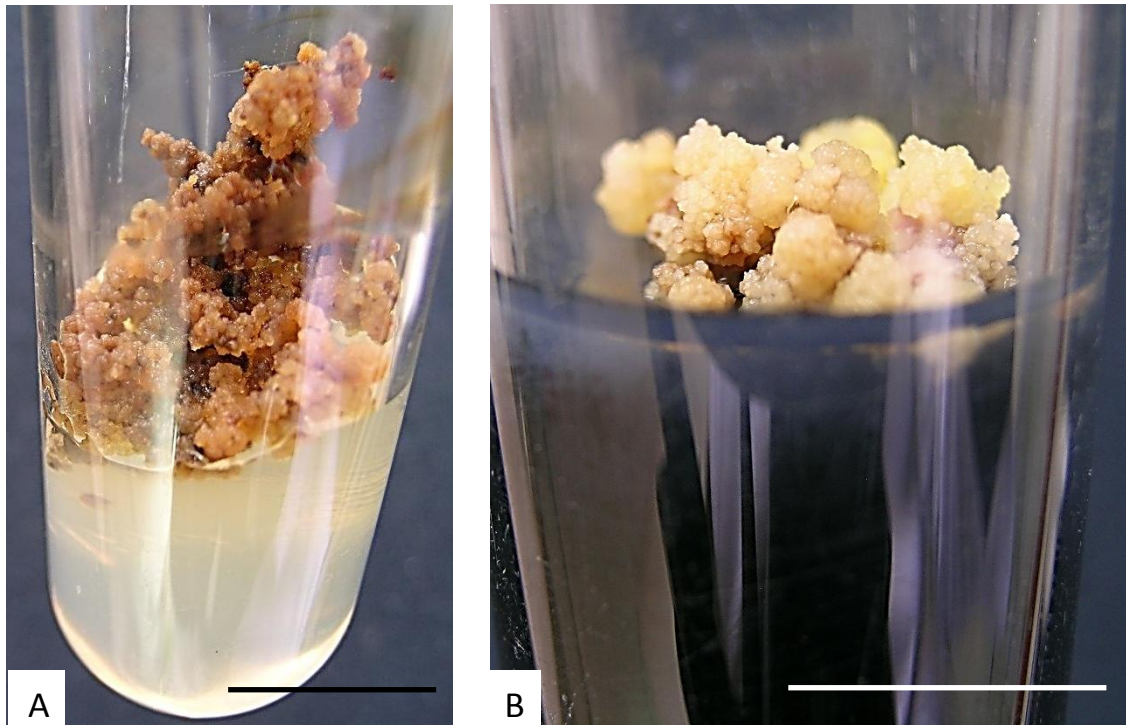
**Figura 7:** Aspecto das culturas de segmentos nodais provenientes da germinação de embriões zigóticos. (A) Ápice caulinar, após 35 dias de cultura sem que se tivesse verificado qualquer desenvolvimento. (B) O mesmo que em A, mas com a formação de zona calosa na base do ápice. As barras correspondem a 1 cm.

Dos 16 tubos em que foram colocados ápices ou segmentos nodais em meios com 0,2 mg/L BA, 10 gemas ficaram necróticas, dois foram contaminados por fungos e 4 ficaram com a cor verde mas não apresentaram qualquer tipo de desenvolvimento. No meio com 0,5 mg/L BA os resultados foram similares.

### 3.2. Manutenção das culturas embriogénicas

Os tecidos embriogénicos mantidos em meio MS com 1 mg/L de 2,4-D desde 1999 continuaram a apresentar capacidade de proliferação e de formação de novos tecidos embriogénicos. No entanto, estes tecidos devem ser subcultivados a cada 4 semanas para que os tecidos não entrem em necrose (Fig. 8A). Se aos meios for adicionado carvão activado (1,5%) verifica-se que os calos podem ser mantidos em cultura mantendo o aspecto embriogénico (Fig. 8B) por períodos mais dilatados (8 semanas de cultura) o que representa uma vantagem importante quando é necessário manipular grandes quantidades de tecidos (Fig. 8). Nestes calos observou-se, por vezes,

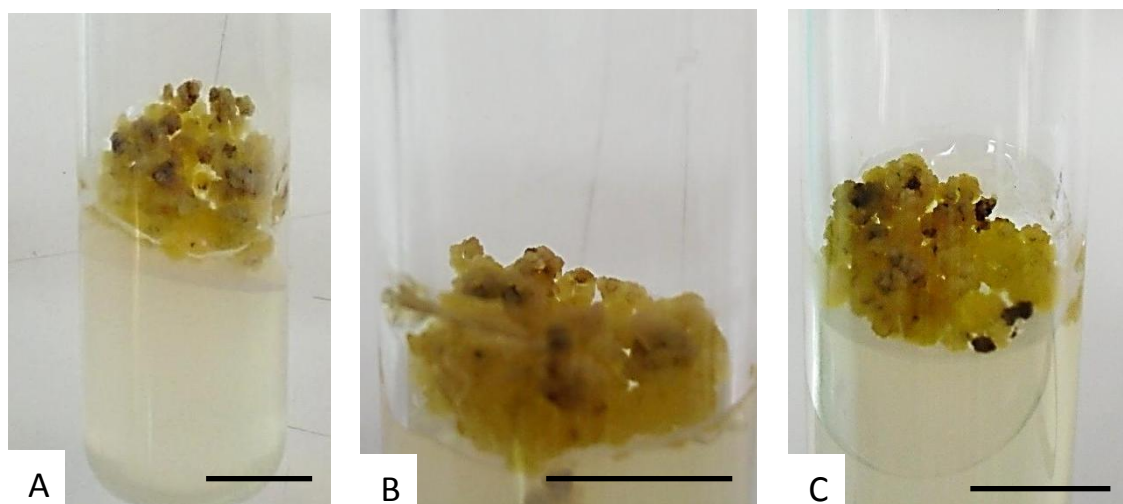
o aparecimento de uma coloração avermelhada indicadora da acumulação de pigmentos antociânicos e da capacidade de diferenciação celular.



**Figura 8:** Manutenção das culturas embriogénicas. (A) Cultura mantida no meio LN1 com 45 dias sendo notória a oxidação dos tecidos embriogénicos. (B) Tecido embriogénico após 45 dias em meio com carvão activado sem ocorrência de oxidação e com zonas avermelhadas resultantes da produção de pigmentos antociânicos. As barras correspondem a 1 cm.

### 3.3. Desenvolvimento de embriões somáticos a partir do tecido embriogénico

Nos ensaios realizados com as hormonas  $GA_3$  e BA ( $LN_{GB1}$ ;  $LN_{GB2}$  e  $LN_{GB3}$ ), não se verificou a evolução do tecido embriogénico em embriões somáticos. Os tecidos embriogénicos transferidos para este meio continuavam a proliferar em novas massas proembriogénicas sem que este tecido tivesse originado embriões somáticos, mantendo-se a coloração amarelada dos calos e o mesmo aspecto morfológico (Figs. 9A-C).



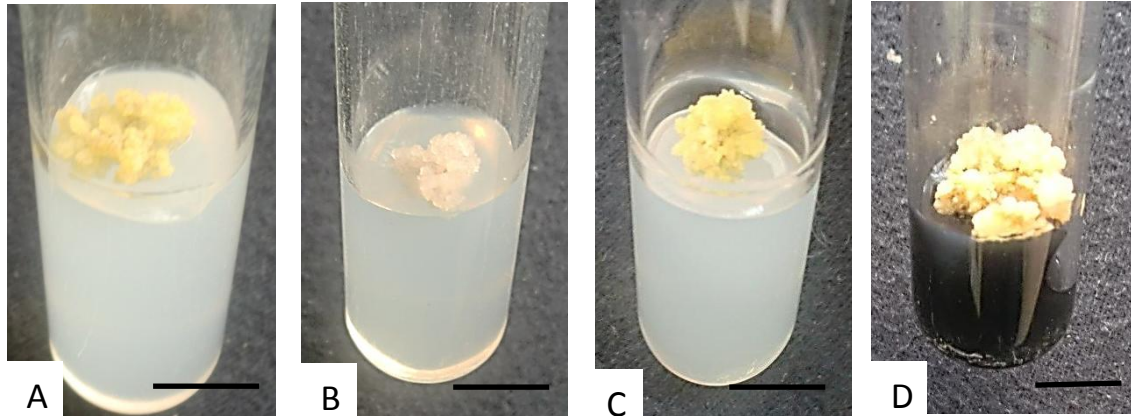
**Figura 9:** Tentativas de desenvolvimento de embriões somáticos a partir do tecido embriogénico mantido em meio LN1. (A) Calo embriogénico em meio MS com 0,5 mg/L GA<sub>3</sub> e 0,5 BA. (B) Calo embriogénico em meio MS com 1 mg/L GA<sub>3</sub> e 0,5 BA. (C) Calo embriogénico em meio MS com 2 mg/L GA<sub>3</sub> e 0,5 BA. As barras correspondem a 1 cm.

O material cultivado em meio LN<sub>A1</sub> e LN<sub>A2</sub> também não apresentou modificações morfológicas dignas de referência relativamente ao material original mantido em meio LN1, continuando os calos embriogénicos a apresentarem cor amarela e uma grande proliferação formando grandes calos mas sem ocorrer formação de embriões somáticos.

Resultados semelhantes aos anteriormente descritos foram registados nos meios LN<sub>AG1</sub>; LN<sub>AG2</sub>; LN<sub>AG3</sub>; LN<sub>AG4</sub>; LN<sub>AG5</sub>; LN<sub>AG6</sub>. À semelhança das situações anteriores ocorreu sempre a proliferação dos tecidos embriogénicos mantendo os calos as mesmas características do meio de manutenção, não se verificando mudanças de cor, nem alterações morfológicas visíveis à lupa.

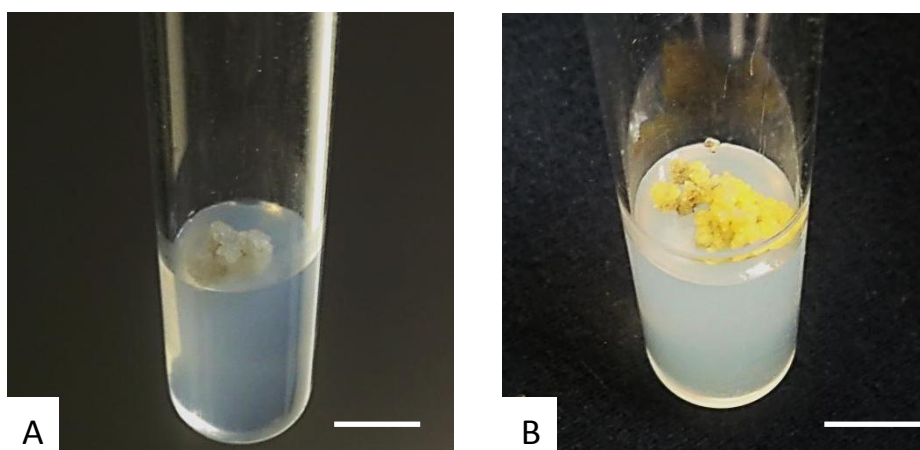
Os ensaios dos dois inibidores testados no tecido LN1 (Fig. 10A) também não foram muito diferentes quanto à conversão do tecido em embriões. A diferença mais notória ocorreu no meio com fluoridona onde o tecido desdiferenciou e apresentou cor esbranquiçada, tendo o material ficado mais friável não apresentando estruturas granulosas (Fig. 10B). No ensaio com o TIBA o calo apenas ficou um pouco menos friável mas a sua cor continuou a ser amarelada (Fig. 10C). Finalmente, observou-se também que os tratamentos do tecido embriogénico com baixas temperaturas não produziram modificações no tecido continuando este a proliferar quando transferido

para a temperatura de 25°C (Fig. 10 D). No entanto, verificou-se que os tratamentos pelo frio, permitem também manter os calos em cultura, sem repicagem, por períodos de 12 semanas sem que adquiram a coloração acastanhada indicadora de oxidação e necrose.



**Figura 10:** Ensaio em material LN1 para obtenção de embriões somáticos. (A) Tecido embriogénico LN1. (B) Tecido embriogénico resultante do tratamento em meio MS com 10 mg/L de fluoridona. (C) Tecido embriogénico resultante do tratamento em meio MS com 10 mg/L de TIBA. (D) Tecido embriogénico resultante dos tratamentos ao frio (1 e 2 semanas) em meio MS com 1,5% de carvão activo. As barras representam 1 cm.

Aquando da transferência do tecido LNf para meio MS sem hormonas o tecido embriogénico voltou a regredir e a readquirir um aspecto semelhante ao mantido em tecido LN1 (Figs. 11A e B).



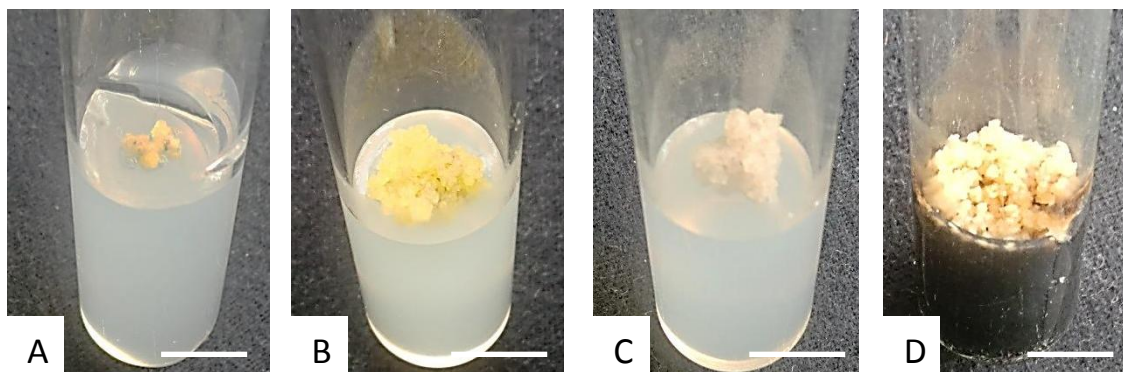
**Figura 11:** Ensaio em tecido embriogénico a partir do material cultivado na presença de fluoridona. (A) Tecido embriogénico, MSf. (B) Tecido embriogénico MSf transferido para meio MS sem hormonas. As barras representam 1 cm.



### 3.3.1. Análise do crescimento das várias culturas caulinares

Com o objectivo de se verificar a capacidade proliferativa do calo embriogénico, cerca de 30 miligramas (Fig. 12A) deste tecido foram inicialmente transferidos para os meios LNt, LNf e para os tratamentos com frio. Para não ocorrer perda de material, a avaliação foi feita em termos qualitativos, através de registo fotográfico.

Entre os dois inibidores o crescimento foi um pouco superior no meio com TIBA (Fig. 12B) do que no meio com fluoridona (Fig. 12C), embora a diferença não seja muito considerável. Nos ensaios com frio e com carvão activo a proliferação foi maior apresentando estes calos maiores dimensões (Fig. 12D).

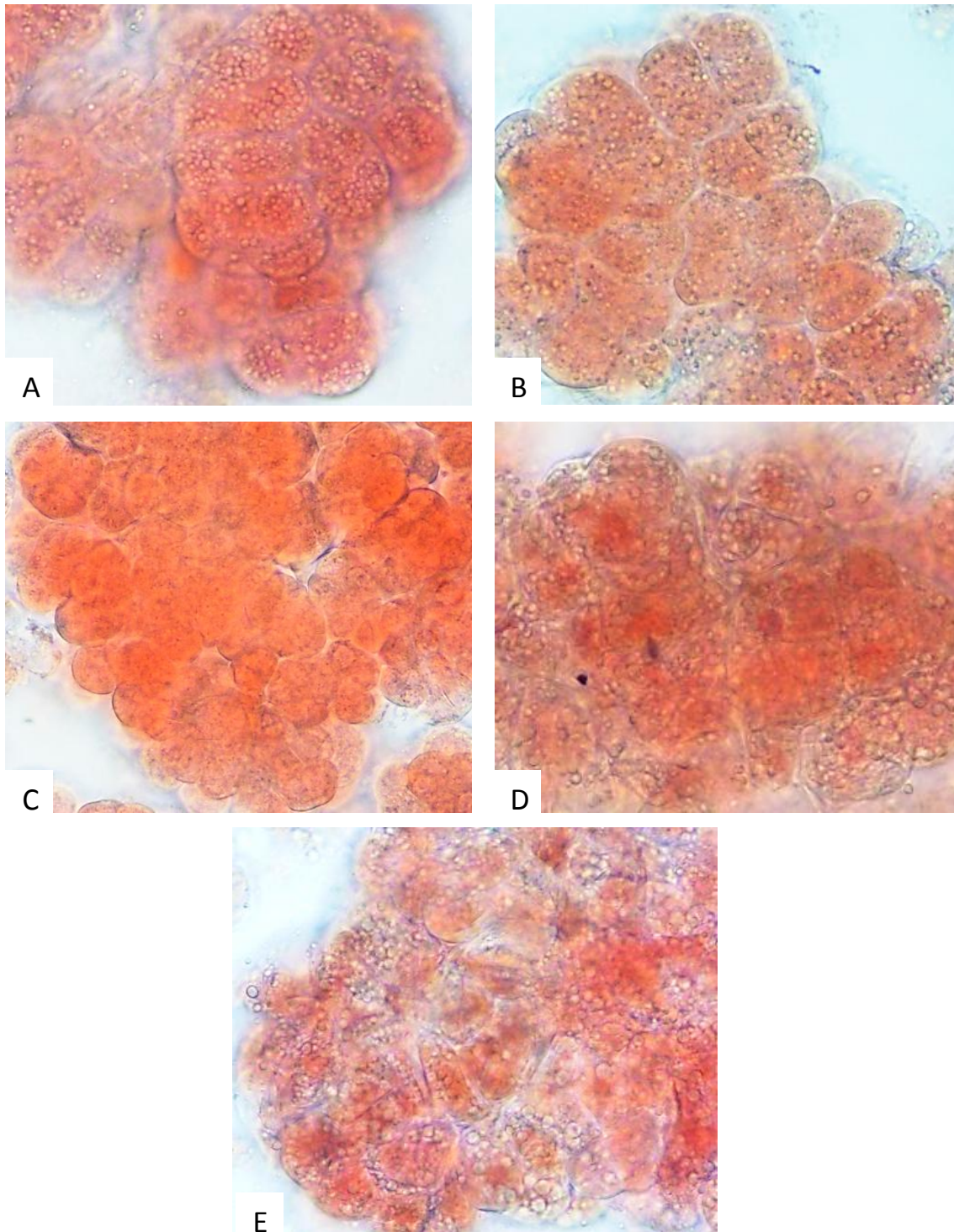


**Figura 12:** Crescimento do calo embriogénico após transferência para diferentes meios. (A) Calo inicial. (B) Tecido embriogénico em LNt, após 25 dias de cultura. (C) Tecido embriogénico LNf, após 25 dias de cultura. (D) Tecido embriogénico dos ensaios com frio em meio com carvão activo, após 25 dias de cultura. As barras correspondem a 1 cm.

### 3.3.2. Análise citológica das culturas embriogénicas

A análise citológica dos calos cultivados em diferentes meios de cultura mostrou que o tratamento com fluoridona levou ao aparecimento de células de menor dimensão e menos vacuolizadas do que as observadas em todos os outros tratamentos, inclusive no controlo (LN1) (Fig. 13A). Estas células, isodiamétricas e com um citoplasma denso, são análogas às células de tipo meristemático (Fig. 13C).

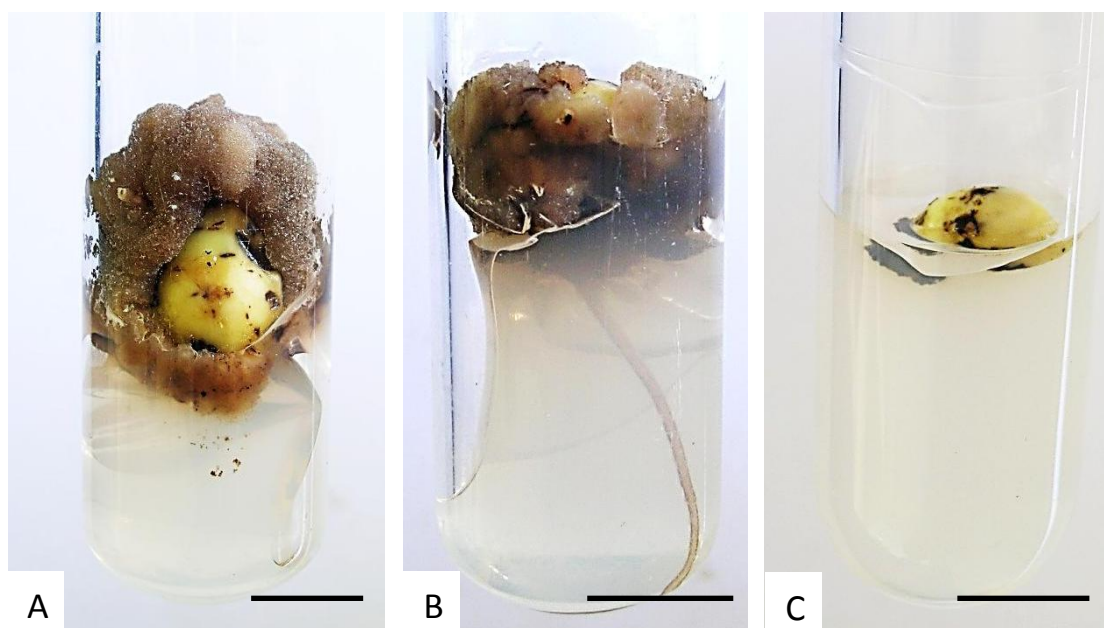
No caso dos tratamentos com TIBA e dos tratamentos em que os calos foram sujeitos a um choque térmico (frio), as células apresentavam dimensões semelhantes em relação ao controlo. Um aspecto que diferenciava as células a crescer na presença de fluoridona (Fig. 13C), relativamente às células noutras condições era a ausência de grandes quantidades de amido (Figs. 13A; B; D e E).



**Figura 13:** Estudos citológicos dos tecidos embriogénicos. (A) Tecido embriogénico LN1 utilizado como controlo, com células de maiores dimensões com grãos de amido. (B) Células do tratamento com TIBA semelhantes ao controlo. (C) Células do tratamento com fluoridona de menores dimensões e menos vacuolizadas onde é notória a reduzida acumulação de amido . (D) Células do tratamento com frio (1 semana) semelhantes em tamanho ao controlo. (E) Células do tratamento com frio (2 semanas) semelhantes em tamanho ao controlo. Imagens ampliadas 756x.

### 3.4. Indução da embriogênese somática em cotilédones de *L. nobilis* e *L. azorica*

Nos explantes colocados em meio MS com 2,4-D, a proliferação celular foi maior quanto maior a concentração da auxina utilizada. Assim, nas concentrações de 2 e 5 mg/L, os cotilédones proliferavam muito, formando grandes massas de cor acastanhada (Figs. 14A e B). Nos explantes cultivados em meio com 1mg/L de 2,4-D não se formavam as grandes massas de cor acastanhada (Fig. 14C), havendo um maior potencial para ocorrer embriogênese somática.

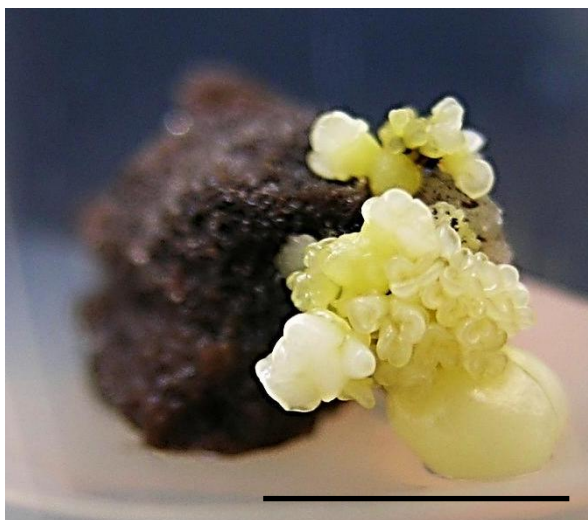


**Figura 14:** Indução de embriogênese somática no loureiro. (A) Cotilédone cultivado em meio MS com 5 mg/L de 2,4-D. (B) Cotilédone cultivado em meio MS com 2 mg/L de 2,4-D. (C) Cotilédone cultivado em meio MS com 1 mg/L de 2,4-D. As barras correspondem a 1 cm.

Os níveis de contaminação foram reduzidos (Tabelas V-VIII), o mesmo se tendo verificado em relação à indução de embriogênese somática (Tabelas V-VIII). Em *L. nobilis* apenas um dos explantes formou embriões somáticos em meio com 1 mg/L de 2,4-D. Em *L. azorica* a formação de embriões somáticos também não ocorreu com muita frequência, tendo ocorrido em dois explantes cultivados em meio com 1 mg/L de 2,4-D e em outros dois submetidos a um tratamento com 2 mg/L da mesma auxina (Tabelas V-VIII). Tanto em *L. nobilis* como em *L. azorica* a embriogênese ocorreu apenas em explantes em os cotilédones foram cultivados com o eixo embrionário e

colocados com a face interna em contacto com o meio, não tendo ocorrido embriogénese em nenhum explante onde os cotilédones foram colocados numa posição inversa (Tabelas V-VIII).

Nos explantes cultivados em meio com Picloram, só ocorreu formação de embriões somáticos num dos explantes de *L. nobilis* (Tabela V e VII). Essa ocorrência verificou-se com a concentração de 1 mg/L de Picloram e ocorreu quando só foi cultivado o eixo embrionário. Os embriões formados tinham um aspecto diferente dos formados no meio com 2,4-D, sendo de maiores dimensões e observando-se algumas das fases características do desenvolvimento embrionário (Fig. 15).



**Figura 15:** Embriões somáticos de *L. nobilis* em diferentes fases de desenvolvimento, formados em meio MS com 1 mg/L de Picloram, após 6 semanas de cultura. A barra corresponde a 0,5 cm.

Nos restantes explantes não houve ocorrência de embriogénese somática, tendo os explantes cultivados nos meios de maiores concentrações de auxina (2 e 5 mg/L), proliferado mais e formado grandes massas com um aspecto esponjoso, de cor acastanhada e esbranquiçada. Nos cotilédones cultivados no meio com 1 mg/L de Picloram a formação dessas massas também ocorria mas com dimensões mais reduzidas.

**Tabela V:** Número de contaminações e de explantes com indução de embriogénese somática em *L. nobilis*, onde os cotilédones foram posicionados com a face externa em contacto com o meio.

Auxina	Número de explantes cultivados	Número de explantes com embriões somáticos	Número de explantes contaminados
2,4-D (1 mg/L)	36	0	0
2,4-D (2 mg/L)	35	0	0
2,4-D (5 mg/L)	37	0	3
Picloram (1 mg/L)	36	1	5
Picloram (2 mg/L)	37	0	1
Picloram (5 mg/L)	37	0	4

**Tabela VI:** Número de contaminações e de explantes com indução de embriogénese somática em *L. nobilis*, onde os cotilédones foram posicionados com a fase interna em contacto com o meio.

Auxina	Número de explantes cultivados	Número de explantes com embriões somáticos	Número de explantes contaminados
2,4-D (1 mg/L)	70	1	2
2,4-D (2 mg/L)	65	0	5

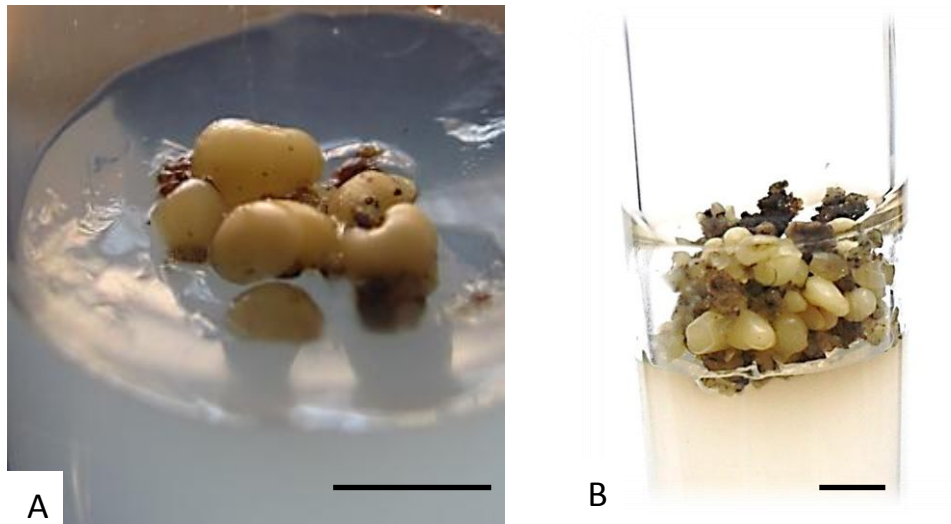
**Tabela VII:** Número de contaminações e de explantes com indução de embriogénese somática em *L. azorica*, onde os cotilédones foram posicionados com a face externa em contacto com o meio.

Auxina	Número de explantes cultivados	Número de explantes com embriões somáticos	Número de explantes contaminados
2,4-D (1 mg/L)	36	0	1
2,4-D (2 mg/L)	37	0	0
2,4-D (5 mg/L)	36	0	5
Picloram (1 mg/L)	35	0	3
Picloram (2 mg/L)	35	0	6
Picloram (5 mg/L)	34	0	5

**Tabela VIII:** Número de contaminações e de explantes com indução de embriogénese somática em *L. azorica*, onde os cotilédones foram posicionados com a fase interna em contacto com o meio.

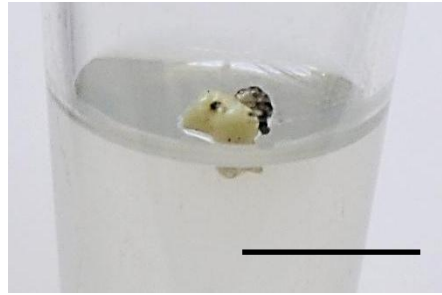
Auxina	Número de explantes cultivados	Número de explantes com embriões somáticos	Número de explantes contaminados
2,4-D (1 mg/L)	36	2	13
2,4-D (2 mg/L)	34	2	9

Os embriões de *Laurus azorica* obtidos nos meios com 2,4-D foram ulteriormente transferidos para meio MS com 1 mg/L onde ocorreram novos ciclos de embriogénese através da formação de embriões secundários a partir dos embriões primários inicialmente formados.(Figs. 16A e B).



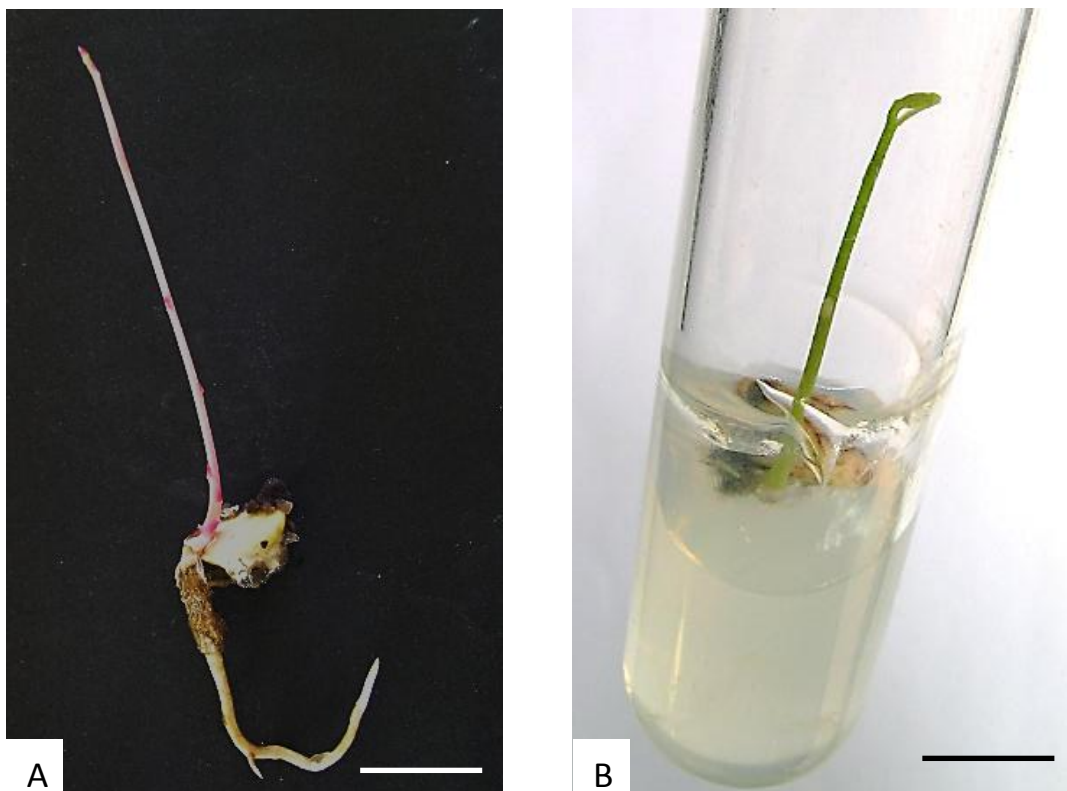
**Figura 16:** Embriogénese somática em *Laurus azorica*. (A) Embriões somáticos primários. (B) Embriogénese somática secundária, após 1 mês em meio MS com 1 mg/L de 2,4-D. As barras correspondem a 0,5 cm.

A embriogénese somática secundária também foi conseguida com os embriões somáticos de *Laurus nobilis* formados no meio com Picloram. Estes foram cultivados em meio MS com adição de 1mg/L de 2,4-D para a ocorrência de embriogénese somática secundária (Fig. 17).



**Figura 17:** Embriogênese somática secundária, a partir de embriões somáticos primários obtidos em meio com Picloram. A barra corresponde a 1 cm.

Nos meios testados para indução de embriogênese somática (2,4-D ou Picloram) ocorreu, com bastante frequência, a germinação dos embriões em que um dos cotilédones foi cultivado juntamente com o eixo embrionário, com a formação de raízes e parte caulinar. Esta última era normalmente formada por um eixo caulinar de dimensões consideráveis, devido ao estiolamento, e com folhas incipientes nas zonas dos nós (Figs. 18A e B).



**Figura 18:** Germinação dos cotilédones de loureiro em meios com auxina. (A) Plântula de *L. nobilis*. (B) Plântula de *L. azorica*. As barras correspondem a 1 cm.

A germinação dos embriões ocorreu principalmente nos meios com a auxina 2,4-D, onde os cotilédones foram cultivados com a face externa em contacto com o meio. A germinação ocorreu em maior número nos meios com concentrações mais reduzidas de 2,4-D, tanto em *L. nobilis*, como em *L. azorica*. Nos meios com Picloram só ocorreu germinação em *L. nobilis* no meio P1 (Tabelas IX-X).

**Tabela IX:** Número de germinações ocorridas em embriões de *L. nobilis*, nos vários meios de indução de embriogénese somática.

Meio utilizado	Número de explantes	Número de germinações
2,4-D (1 mg/L)	36	12
2,4-D (2 mg/L)	35	10
2,4-D (5 mg/L)	37	5
Picloram (1 mg/L)	36	3
Picloram (2 mg/L)	37	0
Picloram (5 mg/L)	37	0

**Tabela X:** Número de germinações ocorridas em embriões de *L. azorica*, nos vários meios de indução de embriogénese somática.

Meio utilizado	Número de explantes	Número de germinações
2,4-D (1 mg/L)	36	9
2,4-D (2 mg/L)	37	4
2,4-D (5 mg/L)	36	2
Picloram (1 mg/L)	35	0
Picloram (2 mg/L)	35	0
Picloram (5 mg/L)	34	0

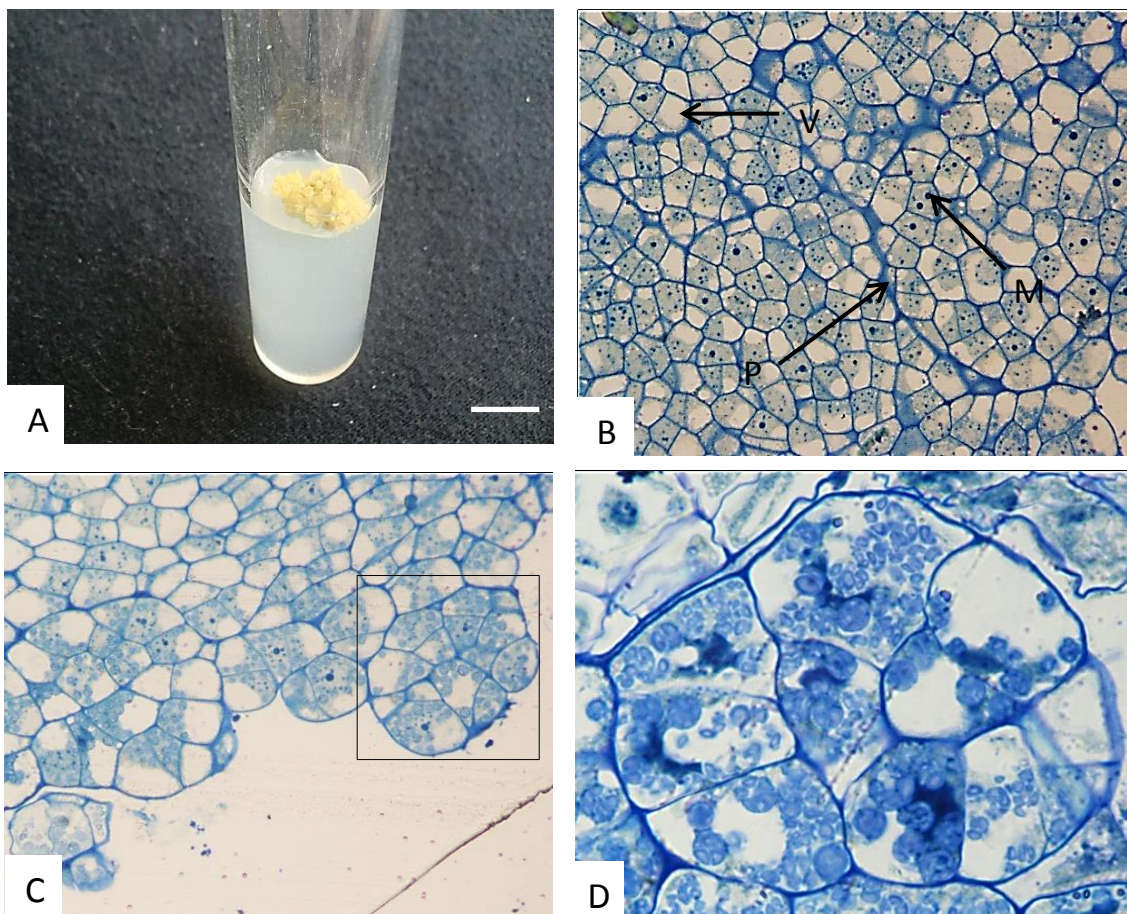
### 3.5. Estudos histológicos

Análises histológicas foram realizadas em diferentes fases da resposta embriogénica. A observação de cortes histológicos relativos aos calos embriogénicos (Fig. 19A) mostrou a existência de dois tipos principais de células. Umas de aspecto mais meristemático, com um núcleo volumoso e pouco vacuolizadas e outros mais



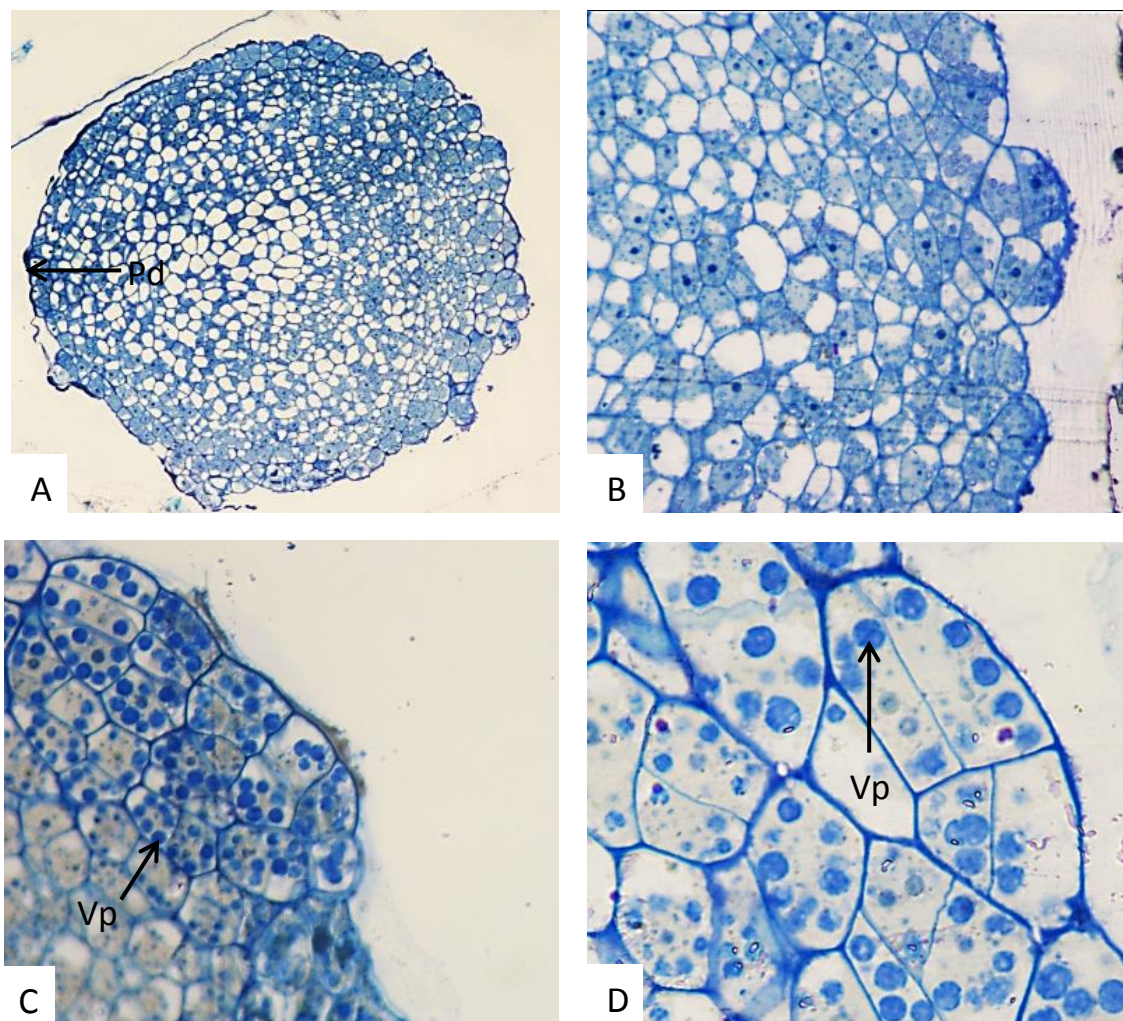
vacuolizadas (Fig. 19B). Nestes calos, observam-se com frequência figuras mitóticas, sinal da capacidade proliferativa deste tipo de calos.

Algumas zonas do tecido surgiam individualizadas por uma parede comum (Figs. 19B e D) que delimitava grupos de células, que correspondem, provavelmente, à formação de massas proembriogénicas. À periferia dos calos embriogénicos eram visíveis novas massas de células em formação (Figs. 19C e D). Mais uma vez, se observou nessas massas a sua delimitação por uma parede comum, mais ou menos espessa.



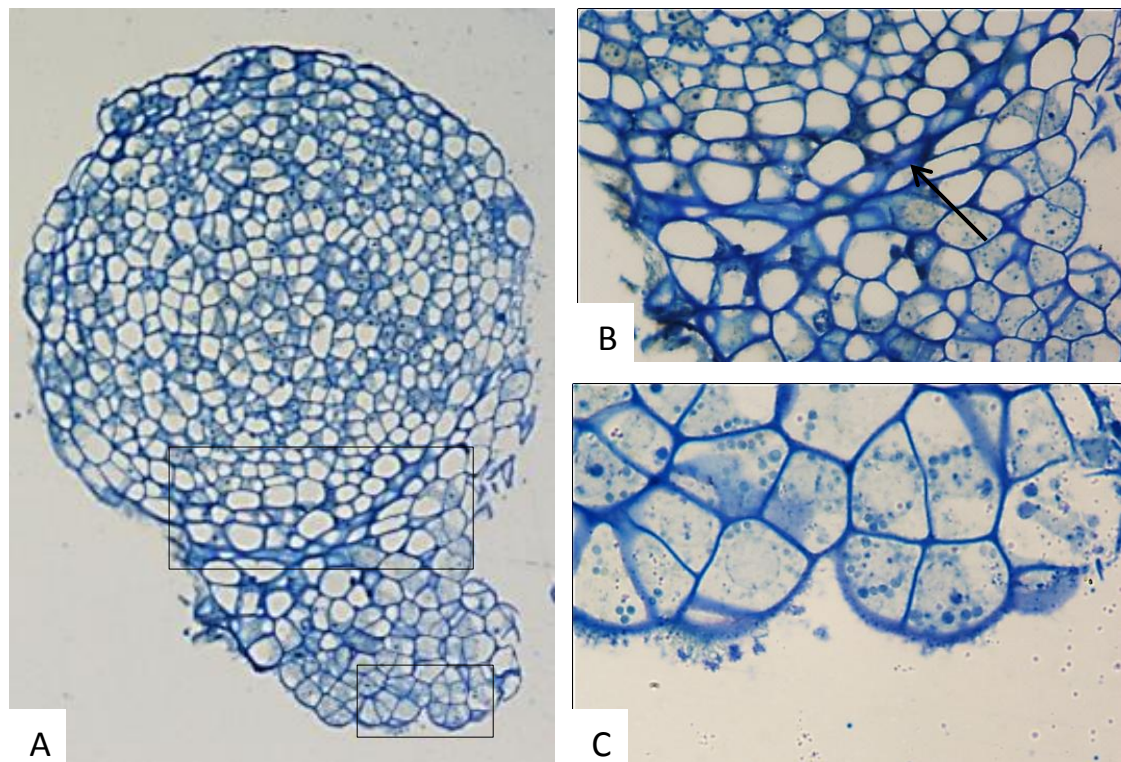
**Figura 19:** Diferentes secções de um calo embriogénico de loureiro. (A) Calo embriogénico em cultura. (B) Secção de um calo embriogénico formado por células meristemáticas (M), células vacuolizadas (V) e com separação de PME por paredes comuns (P) (Ampliação 756x). (C) Zona periférica de um calo onde são visíveis (caixa) novas PEM em formação (Ampliação 756x). (D) Detalhe de uma PME (Ampliação 1890x). A barra corresponde a 1 cm.

A análise histológica de massas pré-embriogénicas (PEM's) isoladas mostrou que as células do centro eram bastante vacuolizadas, enquanto as células da periferia apresentavam um citoplasma mais denso (Fig. 20A). Este tipo de estrutura tem bastante actividade mitótica à periferia, estando estas células em constantes divisões (Fig. 20B). As células da periferia apresentam grande quantidade de vacúolos proteicos (Figs. 20 C e D) e, por vezes, era notória uma camada de células periféricas semelhante a uma protoderme (Fig. 20A).



**Figura 20:** Cortes histológicos de massas pré-embriogénicas (PEMs). (A) Massa pré-embriogénica de loureiro com células vacuolizadas no centro e células com citoplasma mais denso à periferia (Pd - protoderme) (Ampliação 189x). (B) Aspecto da periferia das massas proembriogénicas (Ampliação 756x). (C) Células com bastantes vacúolos proteicos (Vp) (Ampliação 756x). (D) Ampliação da imagem anterior onde são notórios os vacúolos proteicos (Vp) (Ampliação 1890x).

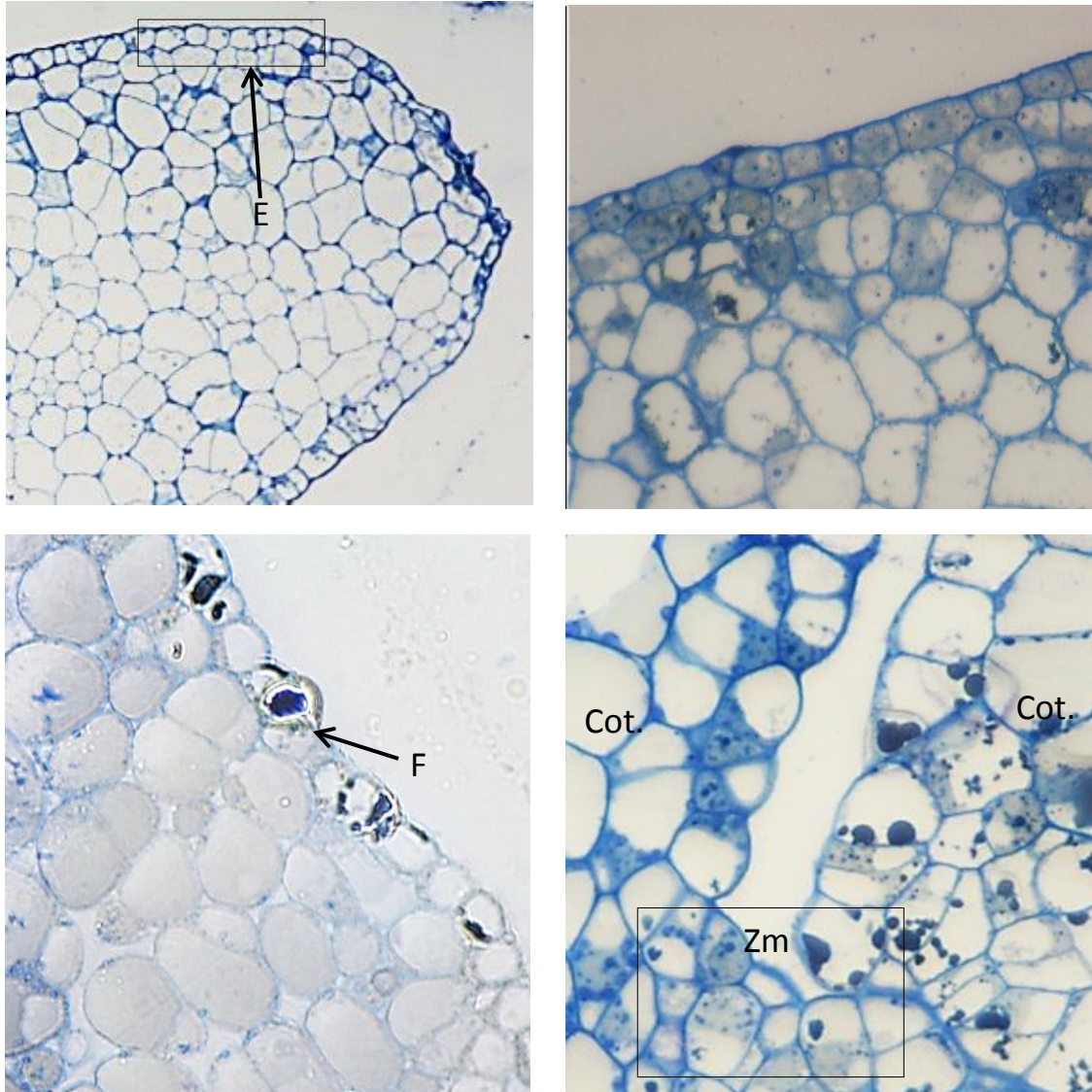
Quando se analisaram embriões em fase globular verificou-se que estes eram formados por células mais uniformes em toda a estrutura quer ao nível das dimensões quer da densidade citoplasmática (Fig. 21A). Em algumas zonas, eram visíveis locais com células que acumulavam fenóis, provavelmente envolvidas na formação de uma zona de separação entre os embriões e o tecido subjacente (Fig. 21B). A actividade mitótica na periferia dos embriões foi também observada (Fig. 21C).



**Figura 21:** Cortes histológicos de embriões somáticos no estado globular. (A) Embrião somático com uma zona rica em fenóis (caixa maior) na zona de contacto com o calo (Ampliação 189x). (B) Detalhe das células ricas em fenóis localizadas na caixa maior da figura anterior (seta) (Ampliação 756x). (C) Zona periférica (caixa mais pequena na figura A) de um embrião somático no estado globular onde se observam novas PME em formação (Ampliação 1890x).

Quando se analisaram secções de cotilédones de embriões em fases mais adiantadas de desenvolvimento (estado cotiledonar) verificou-se que as células eram bastante vacuolizadas, não apresentando praticamente substâncias de reserva (Fig. 22

A). No entanto, em algumas secções observou-se que a zona periférica dos cotilédones (epiderme e mais uma ou duas camadas de células subjacentes) apresentavam um aspecto meristemático (Fig. 22B). A presença de células epidérmicas ricas em fenóis foi também observada com frequência (Fig. 22C). Secções destes embriões ao nível do meristema apical do caule (SAM) mostraram uma fraca diferenciação celular, não havendo distinção entre as células supostamente meristemáticas e as restantes células, o que parece indicar a ausência de diferenciação do SAM (Fig. 22D).



**Figura 22:** Embrião somático em fase cotiledonar. (A) Aspecto geral do cotilédone (E - epiderme) (Ampliação 189x). (B) Zona periférica de um cotilédone com células de citoplasma denso (Ampliação 756x). (C) Células ricas em fenóis na epiderme do cotilédone (F - fenóis) (Ampliação 756x). (D) Zona meristemática do embrião entre os dois cotilédones (caixa) (Cot. - cotilédone; Zm - zona meristemática) (Ampliação 756x).

## 4. Discussão

---

#### 4.1. Estabelecimento de culturas

No estabelecimento de culturas *in vitro* o que se pretende, é o desenvolvimento do maior número de explantes sem contaminações. Depois desta primeira fase, inicia-se a fase de multiplicação do número de plantas para, no final se proceder ao enraizamento e obter plantas. Vários são os obstáculos encontrados nesta técnica de micropropagação como a recalcitrância de vários explantes ou as contaminações endógenas (Bonga, 2010). Além disso, surgem também com frequência dificuldades relacionadas com as condições ambientais ideais e a composição dos meios, em particular no que diz respeito aos reguladores de crescimento (Kanuwar & Kumar, 2008).

Os explantes utilizados para o estabelecimento de culturas *in vitro* neste trabalho foram segmentos nodais de uma árvore adulta, não se conseguindo obter nenhuma planta *in vitro*. O maior dos problemas deveu-se à elevada taxa de contaminações, tendo 84,6% dos explantes ficados contaminados. Os restantes explantes, 15,4%, não se desenvolveram, acabando por ficar necróticos.

A elevada taxa de contaminações deve-se à presença de microrganismos endógenos, que não são eliminados pela desinfecção efectuada, que só elimina os microrganismos à superfície do explante. Este, como já foi referido, é um problema frequente em lenhosas e já foi descrito em várias espécies como *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (Correia *et al.*, 2011) ou *Ocotea bullata* (Kowalski & van Staden, 2001). Para diminuir as elevadas taxas de contaminações podem-se utilizar tratamentos pelo frio antes de se efectuar a descontaminação mas o crescimento do explante é também afectado (Kowalski & van Staden, 2001). Em *Ocotea porosa* a taxa de sobrevivência dos explantes foi muito elevada, tendo 95% dos explantes sobrevivido com apenas 5% de contaminações por fungos. A desinfecção utilizada nesta espécie foi uma passagem em etanol 70% (v/v) durante 30s, seguindo-se uma imersão numa solução de hipoclorito de sódio 0,25 ou 0,5% (v/v) durante 10 min. (Pelegri *et al.*, 2011). O facto de a taxa de contaminação ser muito baixa neste trabalho poderá estar relacionada com a reduzida contaminação endógena, visto que o procedimento de desinfecção não é muito diferente de outros trabalhos já descritos anteriormente com problemas a este nível.

Outro problema deveu-se, possivelmente, ao facto de o meio de indução não ser o mais adequado, não ocorrendo assim desenvolvimento dos explantes que não foram afectados pelas contaminações. O problema pode ser resolvido utilizando um protocolo

de loureiro em que as bases dos ramos jovens foram deixadas em água com adição de ácido indol-3-butírico (IBA) nas concentrações de (0, 1, 2 e 4 g/L), tendo sido depois os explantes cultivados em meio MS com 3% de sacarose, 0,7% de agar, com (BAP; BAP + NAA ou BAP + GA<sub>3</sub>) e com adição de carvão activado (Souayah *et al.*, 2002). A cultura de meristemas também foi conseguida em *Cinnamomum camphora* utilizando para isso o meio WPM (McCown & Amos, 1979) suplementado com BA e cinetina em diversas concentrações (Nirmal Babu *et al.*, 2003). Outro protocolo existente para o estabelecimento de culturas na família Lauraceae é o protocolo em *Ocotea porosa*, onde o meio utilizado foi o meio WPM suplementado com diversas concentrações de BAP e de cinetina e carvão activado (Pelegrini *et al.*, 2011). De referir ainda que a citocinina tidiazurão (TDZ) tem também mostrado bons resultados na micropropagação, (Lu, 1993) através da proliferação de rebentos axilares, podendo ser uma alternativa no caso do loureiro.

Em várias espécies da família Lauraceae um dos principais problemas relacionados com o estabelecimento de culturas são os elevados teores de taninos e compostos fenólicos exsudados para o meio onde sofrem oxidação e interferem com o crescimento. Assim, o papel do carvão activado parece ser fundamental no processo pela capacidade que possui de neutralizar a reacção dos taninos (Souayah *et al.*, 2002). Apesar disso também já foi descrito que os compostos fenólicos podem ter um efeito positivo na proliferação de gemas (Sarkar & Naik, 2000).

Outra das razões para o menor sucesso desta técnica tem a ver com as lesões e com o tamanho do meristema que, aquando da separação do caule pode sofrer lesões, bem como na fase de separação das folhas, limitando o seu potencial de desenvolvimento (Bonga, 2010).

Nos ensaios de cultura dos segmentos nodais e dos ápices caulinares provenientes da germinação dos embriões zigóticos a taxa de sucesso no estabelecimento de culturas também foi de 0%, mas a taxa de contaminações foi muito menor devido ao facto de os explantes já se encontrarem *in vitro* e as contaminações endógenas terem assim sido evitadas. Aqui os problemas deverão ser o meio que não será o ideal e as lesões provocadas no explante quando se separam os segmentos nodais.

O estudo no estabelecimento de culturas em outras espécies lenhosas já foi conseguido com sucesso e o seu estabelecimento permitiu a obtenção de embriogénese

somática através de folhas jovens dessas culturas (Correia *et al.*, 2011). Assim o estudo no estabelecimento de culturas em loureiro deve prosseguir para no futuro a indução de embriogênese somática a partir de material adulto seja conseguida.

#### 4.2. Manutenção das culturas embriogénicas

Tecidos embriogénicos podem ser induzidos e mantidos *in vitro* durante vários ciclos em meios de manutenção apropriados (Merkle *et al.*, 1995) e, sempre que necessário, serem transferidos para um meio de conversão de maneira a obter embriões somáticos. A proliferação das massas embriogénicas normalmente necessita da presença de auxinas (Litz & Gray, 1995).

Em várias plantas lenhosas a obtenção e a manutenção de calo embriogénico foi conseguida (Watt *et al.*, 1991), incluindo em espécies da família Lauraceae como *Persea americana* (Witjaksono & Litz, 1999). Nesta espécie, a manutenção ocorre em meio líquido. Também em *Ocotea catharinensis* se conseguiu a manutenção de calos embriogénicos (Moser *et al.*, 2004). No caso do loureiro já se tinha obtido a formação de calo embriogénico em meios com 1 mg/L de 2,4-D. Este calo pôde ser mantido no mesmo meio ou em meios com 1 mg/L de BA e 0,1 mg/L de NAA, (Canhoto *et al.*, 1999).

Neste trabalho conseguiu-se a manutenção do calo durante dois meses sem que este apresentasse sinais de necrose, aumentando assim o tempo de manutenção do tecido embriogénico. O factor que fez com que a manutenção do tecido se prolongasse foi o carvão activado adicionado ao meio MS com 1 mg/L de 2,4-D. Também em *Ocotea catharinensis* o carvão activado retardou a oxidação (Santa-Catarina *et al.*, 2004). O carvão activado deve funcionar da mesma forma que descrito na secção de estabelecimento de culturas reduzindo os efeitos dos taninos e polifenóis oxidados que são moléculas que estimulam a necrose dos tecidos. Em ensaios futuros, e para otimizar o protocolo, podem-se experimentar diferentes concentrações de carvão activado, para ver em qual das concentrações o explante responde melhor, porque uma concentração baixa pode não ser a suficiente para neutralizar a acção dos fenóis e taninos e concentrações elevadas podem ser prejudiciais para o explante (Thomas, 2008).



### 4.3. Desenvolvimento de embriões somáticos a partir do tecido embriogénico

Calo embriogénico pode ser obtido em plantas lenhosas e a partir deste obter embriões somáticos. O desenvolvimento de embriões somáticos é efectuada com a mudança do tecido embriogénico em meio de manutenção para um meio de conversão.

No loureiro, a formação de calo embriogénico foi conseguida a partir de cotilédones maduros (Canhoto *et al.*, 1999) e neste trabalho tentou verificar-se se, após treze anos de manutenção do tecido em meio MS com 1mg/L de 2,4-D, o tecido embriogénico mantinha a capacidade de originar embriões somáticos quando mudado para os meios de conversão utilizados durante esse trabalho. Verificou-se também através da manipulação dos meios se o tecido tinha a capacidade de originar embriões somáticos.

Nos vários ensaios realizados verificou-se que a proliferação e manutenção do tecido embriogénico pode ser conseguida em todos os meios testados, ocorrendo apenas a formação de massas proembriogénicas, o que permite a manutenção do calo mas em nenhum dos meios foi conseguida a obtenção de embriões somáticos. Apenas no ensaio com a fluoridona não ocorreu formação das estruturas globulares, formando-se um calo com desdiferenciação a nível celular, tendo as células deste calo tipicamente meristemáticas. O mesmo foi verificado por Rúduz *et al.* (2009) podendo tal factor dever-se à não acumulação de grãos de amido observados nas estruturas globulares. A resposta dos explantes ao stresse desencadeia em muitos casos um aumento dos teores de ABA (Zeevaart & Creelman 1988; Wasternack & Hause, 2002 e Rúduz *et al.*, 2009) sendo que a produção desta hormona pela via de síntese de carotenóides foi inibida podendo ser originado uma redução dos níveis endógenos de ABA e consequentemente desdiferenciação do tecido. A análise citológica efectuada a vários tecidos comprova que o tecido sujeito ao tratamento da fluoridona apresenta células com características mais meristemáticas. Segundo Rúduz *et al.* (2009) a diminuição da concentração de ABA ou o aumento de fluoridona diminui o potencial embriogénico e a produção de embriões, o que contradiz os resultados obtidos neste trabalho em que a fluoridona presente no meio afectou de forma favorável a embriogénese somática.

A capacidade de obtenção de embriões somáticos a partir destes tecidos foi perdida ao longo destes anos, o mesmo foi verificado em *Persea americana* (Witjaksono and Litz, 1999) onde a perda de potencial embriogénico se verificou após

três meses a dois anos conforme as diferentes variedades testadas. A perda de potencial embriogénico pode dever-se a alterações genéticas nos calos, como variações somaclonais provocadas pelo excesso de tempo em contacto com auxina o que poderá ter levado à perda da capacidade embriogénica, embora seja necessário um estudo mais aprofundado para comprovar o porquê da perda de capacidade embriogénica dos tecidos (Jin *et al.*, 2008). Em *Ocotea catharinensis* foi testado o crescimento de culturas embriogénicas, e verificou-se que este pode ocorrer sem a acção da hormona 2,4-D se a quantidade inicial de explante fosse reduzido a 1 g, sendo que a acção da auxina 2,4-D era importante para inoculações iniciais de 2 g. Assim a quantidade de explante inicial inoculado pode ser importante para o explante proliferar sem a acção da auxina e eliminar problemas de variação somaclonal (Moser *et al.*, 2004).

#### **4.4. Indução da embriogénese somática em cotilédones de *L. nobilis* e *L. azorica***

A indução de embriogénese somática ocorre em melhores condições quando da utilização de explantes jovens, pouco diferenciados. Neste trabalho utilizaram-se os cotilédones dos embriões zigóticos maduros (frutos maduros) das espécies em estudo, visto que na literatura estes eram referidos como os melhores explantes para se induzir resposta embriogénica (Canhoto *et al.*, 1999). Também em *Ocotea odorifera* se verificou o mesmo, tendo os autores observado que nos embriões demasiado imaturos não se verificou embriogénese somática (Santa-Catarina *et al.*, 2001) podendo este facto dever-se a que os tecidos embriogénicos destes explantes jovens não possuíam competência ou não estavam receptivos à indução com 2,4-D (Tulecke, 1987).

A percentagem de contaminações dos explantes foi baixa tendo sido registado um ensaio com elevadas taxas de contaminação (36%), mas em vários ensaios não ocorreu qualquer contaminação.

A indução de embriogénese somática em *L. nobilis* ocorreu a níveis muito reduzidos (2,8%) na presença de 1 mg/L de 2,4-D tendo os resultados obtidos com Picloram sido semelhantes. Nos restantes ensaios, com as diferentes concentrações destas auxinas não se obtiveram embriões somáticos. As percentagens de indução de embriogénese somática foram muito baixas comparativamente aos dados existentes na literatura, que na mesma espécie tiveram taxas de indução de 35,7% e 41% nos mesmos

meios com concentrações de 1 e 2 mg/L de 2,4-D respectivamente (Canhoto *et al.*, 1999). Em *L. azorica* a indução de embriogénese somática foi baixa tendo-se obtido taxas de indução de 5,6% e 5,9% no ensaio com a auxina 2,4-D, com concentrações de 1 e 2 mg/L, respectivamente. Nos ensaios com 5 mg/L de 2,4-D e nos ensaios realizados com Picloram não ocorreu indução de embriogénese somática. Tal facto poderá dever-se ao menor tempo de cultura a que os explantes estiveram sujeitos ou então os explantes não eram os mais indicados, visto que dentro da mesma espécie explantes de variedades diferentes originam respostas diferentes, como foi referenciado em tamarilho onde alguns génotipos são mais susceptíveis de ocorrência de embriogénese somática do que outros (Correia *et al.*, 2009). Outra hipótese será testar a indução de embriogénese somática através da acção de tidiazurão (TDZ) em meio MS, pois resultados positivos na indução de embriogénese somática foram conseguidos em *Cinnamomum pauciflorum* (Kong *et al.*, 2009) utilizando esta citocinina.

Neste trabalho concentrações elevadas de 2,4-D induziram uma forte proliferação celular, formando-se um calo de cor acastanhada à volta do cotilédone cultivado, não se verificando embriogénese somática nestes explantes. Esta situação ocorria da mesma maneira em cotilédones com eixo embrionário ou sem o eixo embrionário e em ambas as espécies, não se verificando grandes diferenças entre elas. A ocorrência de embriogénese somática com a auxina 2,4-D já foi referenciada em *Ocotea odorifera* em concentrações de 2,4-D muito elevadas (72 e 144  $\mu\text{M}$ ), não ocorrendo em concentrações baixas desta auxina como 9 e 18  $\mu\text{M}$  (Santa-Catarina *et al.*, 2001).

A ocorrência de embriogénese somática com a auxina 2,4-D ocorreu em cotilédones com eixo embrionário, o que está em desacordo com resultados obtidos descritos literatura (Halperin, 1995; Canhoto *et al.*, 1999) que sugerem que o eixo embrionário poderá ter um efeito inibitório na embriogénese somática pela produção de algum tipo de reguladores de crescimento (auxina). A obtenção de embriões somáticos sob acção do Picloram ocorreu quando só foi cultivado o eixo embrionário através de um processo de “one-step embryogenesis” de forma indirecta, formando-se primeiro um calo e posteriormente a formação de embriões somáticos. A indução de embriogénese somática por acção do Picloram já tinha sido descrita em embriões zigóticos de *Persea americana* (Witjaksono and Litz 1999), bem como em eixos embrionários em *O. odorifera* (Santa-Catarina *et al.*, 2001).

Outro factor que poderá ser estudado, é a acção dos compostos fenólicos. Estes estão normalmente associados a factores de necrose dos explantes mas já foi descrito que a presença de compostos fenólicos adicionados exogenamente pode beneficiar a embriogénese somática e a germinação de embriões (Reis *et al.*, 2008).

A embriogénese repetitiva permite a obtenção de um número ilimitado de embriões, podendo ser o melhor método para a obtenção de plantas em larga escala. A embriogénese somática secundária, foi conseguida tanto em *L. azorica* como em *L. nobilis* em meio MS com 1 mg/L de 2,4-D, tendo-se obtido vários ciclos de embriogénese. O mesmo já tinha sido conseguido em *L. nobilis* (Canhoto *et al.*, 1999), bem como outras espécies da família Lauraceae tais como *Persea americana* (Witjaksono & Lits, 1999), *Ocotea odorifera* (Santa-Catarina *et al.*, 2001), *Ocotea catharinensis* (Viana & Mantell, 1999) e também em outras espécies lenhosas como *Salix viminalis* (Grönroos, 1995), manga (DeWald *et al.*, 1989), *Citrus* (Button *et al.*, 1974) e *Rosa hybrida* (Robert *et al.*, 1995).

Na embriogénese somática secundária foi possível visualizar embriões somáticos em várias fases de desenvolvimento, podendo no mesmo explante ser encontrados embriões em fase globular ou em fase cotiledonar, sendo o número por explante também muito variável tal como ocorreu em vários trabalhos (Canhoto *et al.*, 1999; Santa-Catarina *et al.*, 2004).

Em alguns dos cotilédones cultivados ocorreu germinação devido ao desenvolvimento da parte caulinar e da parte radicular do eixo embrionário associado ao cotilédone. A germinação verificou-se principalmente em meios onde estava presente a auxina 2,4-D, tendo as taxas de germinação sido maiores nas menores concentrações da auxina ocorrendo um decréscimo à medida que a concentração aumentava. Estes resultados são semelhantes tanto em *L. azorica* como em *L. nobilis*, sendo que nesta última espécie a percentagem de germinação foi maior. A germinação de embriões zigóticos foi conseguida em *Ocotea odorifera* embora neste estudo o que se pretendia era a indução de germinação e não de embriogénese somática (Santa-Catarina *et al.*, 2001).

Em ensaios futuros deve tentar-se melhorar as taxas de indução de embriogénese somática com outros PGRs (e.g. TDZ) ou encontrar explantes que respondam melhor às auxinas utilizadas neste trabalho. A conversão de embriões somáticos em plantas não

foi estudada neste trabalho, sendo que está descrito na literatura um só trabalho onde foi tentado. Nesse trabalho, Canhoto *et al.* (1999) conseguiram a conversão de embriões somáticos em plântulas numa taxa muito reduzida 5% em meio contendo 1 mg/L de GA<sub>3</sub> e 0,5 mg/L de BA e mesmos estes embriões que germinaram, tinham anomalias morfológicas e ficaram necróticos. Assim, é necessário realizar mais estudos nesta área, podendo o problema estar relacionado com o meio de cultura utilizado (Merkle *et al.*, 1995) ou anomalias estruturais nos embriões somáticos que não permitem a germinação (Kong & Yeung, 1992).

#### 4.5. Estudos histológicos

Na análise efectuada aos embriões somáticos, os calos embriogénicos estão organizados em estruturas globulares, delimitadas por uma espécie de parede celular comum. A separação de cada uma dessas estruturas deve ocorrer com a acumulação de compostos fenólicos no local de separação. As anomalias apresentadas pelos embriões somáticos detectadas por Canhoto *et al.*, (1999) podem dever-se ao facto de na fase cotiledonar os embriões não apresentarem compostos de reservas. Esta situação contrasta com o que se verificou em estádios de desenvolvimento anteriores onde nas PEMs se detectou a presença de vacúolos proteicos. Estes resultados parecem sugerir que a partir de um certo estado de desenvolvimento os embriões consomem as reservas acumuladas em fases mais precoces, ao contrário do que tem sido descrito durante o desenvolvimento embrionário de embriões zigóticos (Canhoto, 2010). A importância das substâncias de reserva acumuladas pelos cotilédones foi descrita como sendo necessária para o metabolismo durante a germinação dos embriões (Bewley & Black, 1994) sendo que o meio não deverá apresentar as condições necessárias para a germinação dos embriões somáticos. A ausência do SAM observada em algumas secções de embriões somáticos, poderá também explicar a reduzida conversão dos embriões em plantas observada por Canhoto *et al.* (1999). Verificou-se também a presença de compostos fenólicos nas células da epiderme dos cotilédones mais desenvolvidos, podendo estes compostos serem lançados ao meio de cultura e dificultar a conversão dos embriões. A adição de carvão activado ou de compostos antioxidantes ao meio poderá ser uma solução para este problema pelos factores já referidos anteriormente.

## 5. Conclusões e perspectivas futuras

## 5. Conclusões e perspectivas futuras

A indução de embriogénese somática em espécies lenhosas tem sido conseguida em várias espécies, mas com muitas dificuldades em conseguir um protocolo que seja eficaz e reprodutível na maior parte dos casos. Obstáculos como são a proliferação contínua dos calos, a recalcitrância do material ou as anomalias encontradas nos embriões somáticos, são factores que condicionam em muito a aplicação prática dos protocolos de embriogénese somática. Neste sentido, muitos autores continuam a tentar otimizar a embriogénese somática com o propósito de tornar esta técnica mais eficaz em termos de propagação *in vitro* de plantas com valor económico ou de espécies ameaçadas. Neste trabalho tentou-se melhorar o protocolo de indução da embriogénese somática em loureiro, bem como estimular o desenvolvimento de novas culturas embriogénicas em embriões somáticos.

Os resultados obtidos mostram que a obtenção de culturas embriogénicas em cotilédones de loureiro pode ser alcançada por acção de outras auxinas como se verificou com o Picloram, não se sabendo se os embriões obtidos desta nova cultura apresentavam menos anomalias do que os obtidos por indução com 2,4-D. Estudos histológicos deverão ser efectuados nesta nova cultura para mostrar se existem diferenças. Poderão também ser testados meios com carvão activado ou com compostos antioxidantes para neutralizar os efeitos dos fenóis e dos taninos e retardar a oxidação dos explantes. A embriogénese somática secundária foi conseguida em *L. azorica*, permitindo a multiplicação do número de embriões somáticos inicialmente formados. Não existe ainda um protocolo eficiente para o desenvolvimento e ulterior conversão dos embriões somáticos. Os estudos histológicos efectuados demonstraram algumas limitações que poderão explicar a dificuldade de conversão destes embriões somáticos, como são a ausência de SAM e ausência de substâncias de reserva em fases avançadas do desenvolvimento. No futuro deverá ser desenvolvido um protocolo mais eficiente onde taxas mais elevadas de germinação possam ocorrer.

No estabelecimento de culturas o protocolo testado mostrou-se ineficaz uma vez que nenhum explante se desenvolveu e a obtenção de plantas *in vitro* por este método não foi conseguida. O maior problema deveu-se ao facto de uma grande percentagem de explantes terem contaminações endógenas. No futuro devem utilizar-se outros

protocolos, com outros meios e hormonas com vista ao estabelecimento de culturas de loureiro.

No tecido embriogénico mantido em cultura durante treze anos, pretendia-se verificar se mantinha a capacidade de desenvolver embriões somáticos. Os resultados mostraram que esta capacidade foi perdida ao longo desses anos visto que em nenhum dos ensaios se conseguiu promover formação de embriões somáticos, embora no estudo efectuado com fluoridona o tecido embriogénico tenha desdiferenciado a as células apresentado características meristemáticas, sem a ocorrência dos grãos de amido revelados nos tecidos embriogénicos dos outros ensaios. Os motivos da perda de capacidade não são conhecidos, devendo-se efectuar estudos para perceber as alterações ocorridas nos tecidos embriogénicos.



## 6. Referências Bibliográficas

- Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J. & Filanova, A. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 233-249.
- Barros, C. F., Callado, C. H., Costa, C. G., Pugialli, H. R. L., Cunha, M. & Marquete, O. (1997). *Madeira da Mata Atlântica*, 1ª Ed. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro 1: 86.
- Bewley, J. D. & Black, M. (1994). *Seeds – Physiology of Development and Germination* (2nd Ed.). Plenum Press, New York.
- Bonga, J. M., Klimaszewska, K. K. & von Aderkas, P. (2010). Recalcitrance in clonal propagation in particular of conifers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 100: 241-254.
- Bonnier, G. (1957). *Flore complete de France, Suisse et Belgique*. Librairie Général de L'Enseignement, Paris.
- Bremness, L. (1990). *Plantas Aromáticas*. Editora Civilização, Lisboa.
- Button, J., Kochba, J. & Bornman, C. H. (1974). Fine structure and embryoid development from embryogenic ovular callus of “Shamouti” Orange (*Citrus sinensis* Osb.). *Journal of Experimental Botany* 25: 446-457.
- Capron, A., Chatfield, S., Provart, N. & Berleth, T. (2009). Embryogenesis: Pattern Formation from a Single Cell. *The Arabidopsis Book* 7: 1-28.
- Canhoto, J. M. & Cruz, G. S. (1996). Histodifferentiation of somatic embryos in cotyledons of Pineapple guava (*Feijoa sellowiana* Berg). *Protoplasma* 191: 34-45.
- Canhoto, J. M., Lopes, M. L. & Cruz, G. S. (1999). Somatic embryogenesis induction in Bay Laurel (*Laurus nobilis*). In: S. M. Jain, P. K. Gupta & R. J. Newton (Eds.), *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht Vol. 4 pp. 341-367.
- Canhoto, J. M. (2010). *Biotechnology Vegetal – de clonagem de Plantas à Transformação Genética*. Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra.

- Chawla, H. S. (2009). Introduction to Plant Biotechnology (3rd Ed). Science Publishers, Inc., Enfield, NH, USA.
- Chen, M. & Wang, P. (1985). Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration on *Sassafras randaiense* (Hay.) Rehd. Bot. Bull. Academia Sinica 26: 1-12.
- Correia, S. & Canhoto, J. M. (2010). Characterization of somatic embryo attached structures in *Feijoa sellowiana* Berg. (Myrtaceae). Protoplasma 242: 95-107.
- Correia, S., Lopes, M. L. & Canhoto, J. M. (2009). Somatic embryogenesis in tamarillo (*Cyphomandra betacea*): recent advances. Acta Horticulturae 839:157-164.
- Correia, S., Lopes, M. L. & Canhoto, J. M. (2011). Somatic embryogenesis induction system for cloning in adult *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (tamarillo). Trees 25: 1009-1020.
- Correia, S., Cunha, A. E., Salgueiro, L. & Canhoto, J. M. (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.
- Coutinho, A. X. (1974). Flora de Portugal, 2ª eds. Wheldon & Wesley, Lda. Stechert-Hafner service agency, Inc. Codicode, Herts. New York.
- Cronquist, A. (1988). The evolution and classification of flowering plants. 2nd Ed. New York, New York Botanical Garden, pp. 517.
- Cruz-Hernández, A., Witjaksono, Litz, R. E. & Gomés Lim, M. (1998). *Agrobacterium tumefaciens* – mediated transformation of embryogenic avocado cultures and regeneration of somatic embryos. Plant Cell Report 17: 497-503.
- Debnath, S. C. (2004). Clonal propagation of dwarf raspberry (*Rubus pubescens* Raf.) through *in vitro* axillary shoot proliferation. Plant Growth Regulation. 43: 179-186.
- DeWald, S. G., Litz, R. E. & Moore, G. A. (1989). Optimizing somatic embryo production in mango. Journal of the American Society for Horticultural Science 114: 712-716.

- Dhanalakshmi, S. & Lakshmanan, K. K. (1992). *In Vitro* Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in *Clitoria ternatea* Journal of Experimental Botany 43: 213-219.
- Dodeman, V. L., Ducreax, G. & Kreis, M. (1997). Zygotic embryogenesis versus Somatic embryogenesis. Journal of Experimental Botany 48: 1493-1509.
- Durzan, D. J., Jokinen, K., Guerra, M. P., Santerre, A., Chalupa, V. & Havel, L. (1994). Latent Diploid Parthenogenesis and Parthenote Cleavage in Egg-Equivalents of Norway spruce. International Journal of Plant Science 155: 677-688.
- Fehér, A., Pasternak, T. P. & Dudits, D. (2003). Review of Plants Biotechnology and Applied Genetics. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 74: 201-228.
- Fehér, A. (2005). Why Somatic Plant Cells Start to form Embryos? In: Mujib, A. & Samaj, J. Somatic Embryogenesis. Springer- Verlag Berlin Heidelberg, pp 85-101.
- Figuerola, F., Avalos, R. & Vargas, V. (2006). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 86: 285-301.
- Franco, J. A. (1971). Nova Flora de Portugal (Continente e Açores). Vol. 1. Sociedade Astória, Lda., Lisboa.
- Gaj, M. D. (2004). Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Plant Growth Regulation 43: 27-47.
- George, E. F., Hall, M. A. & De Klerk, G. (2008). Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Ed. The Background. Springer, Dordrecht. Plant Tissue Culture Procedure – Background 1: 1-28.
- Grönroos, L. (1995). Somatic embryogenesis in *Salix*. In: Jain, S., Gupta, P. & Newton, R. (Eds.). Somatic embryogenesis in Woody Plants, Vol. 2: Angiosperms Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 219-234.

- Haccius, B. (1977). Question of unicellular origin of non-zygotic embryos in callos cultures, *Phytomorphology* 28: 74-81.
- Hall, J. L. (1978). *Electron Microscopy and Cytochemistry of Plant Cells*. Elsevier. New York.
- Halperin, W. (1995). In vitro embryogenesis: some historical tissues and unresolved problems. In: Thorpe, T.A. (Ed.), *In vitro Embryogenesis in Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 1-16.
- Hegi, G. (1958). *Illustrierte Flora Von Mitteleuropa*, vol. IV. Carl Hanser Verlag. München.
- Iliev, I., Gajdošová, A., Libiaková, G. & Jain, S. M. (2010). *Plant Micropropagation. Plant Cell Culture*. Ed. Davey, M. R. & Anthony, P. John Wiley & Sons, Lda.
- Jiménez, V. M. & Thomas, C. (2005). Participation of Plant Hormones in Determination and Progression of Somatic Embryogenesis. In: Mujib, A. & Samaj, J. *Somatic Embryogenesis*. Springer – Verlag Berlin Heidelberg, pp 103-118.
- Jin, S., Mushke, R., Zhu, H., Tu, L., Lin, Z., Zhang, Y. & Zhang, X. (2008). Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers. *Plant Cell Reports* 27: 1303-1316.
- Johri, B. M. (1984). *Embryology of Angiosperms*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York Tokyo
- Kanuwar, J. K. & Kumar, S. (2008). In vitro propagation of *Gerbera* - A Review. *Horticultural Science*. 35: 35-44.
- Koltunow, A. M. (1993). Apomixis: Embryo Sacs and Embryos formed without Meiosis Fertilization in Ovules. *Plant Cell* 5: 1425-1437.
- Koltunow, A. M., Bicknell, R. A. & Chaudhury, A. M. (1995). Apomixis: molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. *Plant Physiology* 108: 1345-1352.

- Koltunow, A. M., Hidaka, T. & Robinson, S. P. (1996). Polyembryony in *Citrus* – Accumulation of Seed Storage Proteins in Seeds and in Embryos Cultured *in Vitro*. *Plant Physiology* 110: 599-609.
- Komamine, A., Kawahara, R., Matsumoto, M., Sunabori, S., Toya, T., Fujiwara, A., Tsukaharam, M., Smith, J., Ito, M., Fukuda, H., Nomura, K. & Fujimura, T. (1992). Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro Cellular Developmental Biology* 28: 11-14.
- Kong, L., Dai, D., Shang, M., Li, K. & Zhang, C.-X. (2009). Thidiazuron - induced somatic embryos, their multiplication, maturation and conversion in *Cinnamomum pauciflorum* Nees (Lauraceae). *New Forests* 38: 131-142.
- Kong, L. & Yeung, E. C. (1992). Development of white spruce somatic embryos. II. Continual shoot meristem development during germination. *In Vitro Cellular Developmental Biology* 28: 125-131.
- Kowalski, B. & van Staden, J. (2001). *In vitro* culture of two threatened South African medicinal trees - *Ocotea bullata* and *Warburgia salutaris*. *Plant Growth Regulation*. 34: 223-228.
- Krikorian, A. D. (2000). Historical insights into some contemporary problems in somatic embryogenesis. In: Jain, S. M., Gupta, P. K. & Newton, R. J. (Eds.) *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Kluwer Academic Publishers pp. 17-49.
- Lanzara, P., Mariella, P. & Schuler, S. (1978). *Trees*. Simon & Schuster Inc., New York.
- Litz, R. E. & Gray, D. J. (1995). Somatic embryogenesis for agricultural improvement. *World J. Micro. Biotech.* 11: 416-425.
- Litz, R. E., Raharjo, S. H. T. & Gomes Lim, M. A. (2007). Avocado. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 60 Transgenic Crops V* (Eds.) by Pua, E. C. & Davey, M. R.). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.

- Lu, C. Y. (1993). The use of thidiazuron in tissue culture. *In Vitro Cellular Development Biology* 29: 92-96.
- Marques, C. A. (2001). Importância Económica da Família Lauraceae Lindl. *Floresta e Ambiente* 8: 195-206.
- Márquez-Martín, B., Sesmero, R., Quesada, M. A., Pliego-Alfaro, F., & Sánchez-Romero, C. (2011). Water relations in culture media influence maturation of avocado somatic embryos. *Journal of Plant Physiology* 168: 2028-2034.
- McCown, B. H. & Amos, R. (1979). Initial trials of commercial micropropagation with birch selections. *International Plant Propagators Society Combined Proceedings* 29: 387-393.
- Merkle, S. A., Parrott, W. A. & Flinn, B. S. (1995). Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: Thorpe, T. A. (Ed.) *In vitro* Embryogenesis in Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 115-203.
- Merkle, S. A., Wiecko, A. T., Sotak, R. J. & Sommer, H. E. (1990). Maturation and conversion of *Liriodendron tulipifera* somatic embryos. *In Vitro Cellular Developmental Biology* 26: 1086-1093.
- Metcalfe, R. C. (1987). *Anatomy of the dicotyledons*. 2nd Edn., Vol. III. Oxford: Clarendon Press.
- Mooney, P. A. & Van Standen, J. (1987). Induction of embryogenesis in callus from immature embryos of *Persea americana*. *Can. J. Bot* 65: 622-626.
- Mordhorst, A. P., Toonen, M. A. & de Vries, S. C. (1997). Plant Embryogenesis. *Critical Review in Plant Sciences* 16: 535-576.
- Moser, J. R., Garcia, M. G. & Viana, A. M. (2004). Establishment and growth of embryogenic cultures of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 78: 37-42.
- Moura-Costa, P. H., Viana, A. M. & Mantell, S. H. (1993). In vitro plantlet regeneration of *Ocotea catharinensis*, an endangered Brazilian hardwood forest tree. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 35: 279-286.

- Murashige, T. & Shoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15: 473-497.
- Nirmal Babu, K., Sajina, A., Minoo, D., John, C. Z., Mini, P. M., Tushar, K. V., Rema, J. & Ravindran, P. N. (2003). Micropropagation of camphor tree (*Cinnamomum camphora*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 179-183.
- Ozias-Akins, P. (2006). Apomixis: Developmental Characteristics and Genetics. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25: 199-214.
- Park, S. & Harada, J. (2008). *Arabidopsis* embryogenesis. In: Suárez, M. F. & Bozhkov, P. V. (Eds.), *Plant embryogenesis*. Humana Press, New Jersey, pp. 1-16.
- Pelegri, L. L., Ribas, L. L. F., Zanette, F. & Koehler, H. S. (2011). Micropropagation of *Ocotea porosa* (Nees & Martius) Barroso. *African Journal of Biotechnology* 10: 1527-1533.
- Pliego-Alfaro, F. & Murashige, T. (1988). Somatic embryogenesis in avocado (*Persea americana* Mill.) in vitro. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 12: 61-66.
- Polunin, O. (1982). *Guia de Campo de las Flores de Europa*. Ediciones Omega, Barcelona.
- Raghavan, V. (1986). *Embryogenesis in Angiosperms – A developmental and experimental study*. Cambridge University Press, London.
- Raghavan, V. (2006). Maturation and dormancy – survival strategies of the embryo. Double fertilization – embryo and endosperm development in flowering plants. Springer – Verlag, Berlin, pp. 131-149.
- Reis, E., Batista, M. T. & Canhoto, J. M. (2008). Effect and analysis of compounds during somatic embryogenesis induction in *Feijoa sellowiana* Berg. *Protoplasma* 232: 193-202.
- Robert, A. V., Yokoya, K., Walker, S. & Mottley, J. (1995). Somatic embryogenesis in *Rosa* Sp. In: Jain, S., Gupta, P. & Newton, R (Eds.). *Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Vol. 2: Angiosperms*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 277-280.



- Rocha, F. (1996). Nomes vulgares de plantas existentes em Portugal. Protecção da produção agrícola, edição especial.
- Rose, R. J., Mantiri, F. R., Kurdyukov, S., Chen, S-K., Wang, X-D., Nolan, K.E., & Sheahan, M. B. (2010). Developmental Biology of Somatic Embryogenesis. In: Pua, E-C. & Davey, M. R. (Eds.), Plant Developmental Biology – Biotechnological Perspectives. Springer, Berlin.
- Rúduz, I., Weiler, E. W. & Kepczynska, (2009). Do stress-related phytohormones, abscisic acid and jasmonic acid play a role in the regulation of *Medicago sativa* L. somatic embryogenesis? Plant Growth Regulation 59: 159-169.
- Sampaio, G. (1988). Flora Portuguesa. Instituto Nacional de Investigação Científica, Lisboa.
- Santa-Catarina, C., Maciel, S. C. & Pedrotti, E. L. (2001). Germinação *in vitro* e embriogénese somática a partir de embriões imaturos de canela sassafrás (*Ocotea odorífera* Mez). Revista Brasil. Bot., 24: 501-510.
- Santa-Catarina, C., Oimedo, A. S., Meyer, G. A., Macado, J., Amorim, W. & Viana, A. M. (2004). Repetitive embryogenesis of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae): effect of somatic embryo developmental stage and dehydration. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 78: 55-62.
- Sarkar, D. & Naik, P. S. (2000). Phloroglucinol enhances growth and rate of axillary shoot proliferation in potato shoot tip cultures *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 60:139-149.
- Schroeder, C. A. (1989). The Laurel of Bay Forests of the Canary Islands. California Avocado Society. Yearbook 73: 145-147.
- Sharp, W. R., Söndahl, M. R., Caldas, L. S. & Maraffa, S. B. (1980). The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. Horticult. Reviews 2: 268-310.
- Shi, X., Dai, X. Liu, G., Zhang, J., Ning, G. & Bao, M. (2010). Cyclic Secondary somatic embryogenesis and efficient plant regeneration in camphor tree (*Cinnamomum camphora* L.). *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant* 46: 117-125.

- Silva, J. S. (2007). Árvores e florestas de Portugal, Açores e Madeira. A floresta das ilhas. Vol. 6 Fundação Luso-Americana, Lisboa.
- Skoog, F. & Miller, C. O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology* 11: 118-131.
- Souayah, N., Khouja, M. L., Khaldi, A., Rejeb, M. N. & Bouzid, S. (2002). Breeding improvement of *Laurus nobilis* L. by conventional and in vitro propagation techniques. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* 9: 101-105.
- Sprecher, S. L., Netherland, M. D. & Stewart, A. B. (1998). Phytoene and carotene response of aquatic plants to fluridone under laboratory conditions. *Journal of Aquatic Plants Management* 36: 111-120.
- Spurr, A. R. (1969). A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research* 26: 31-43.
- Strasburger, E. (1878). Uber Polyembryonie, *Jenaische Z. Naturwiss* 12: 647-670.
- Stasolla, C. & Yeung, E. C. (2003). Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 15-35.
- Street, H. E. & Withers, L. A. (1974). The anatomy of embryogenesis in culture, in *Tissue Culture and Plant Science*, Street, H. E., Ed., Academic Press, London/New York. 71.
- Stuart, D. A. & Strickland, S. G. (1984). Somatic embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa* L. 1. The role of amino acid additions to the regeneration medium 34: 165-174.
- Thomas, T. D. (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances* 26: 618-631.
- Thorpe, T. A. (1980). Organogenesis in vitro: structural, physiological and biochemical aspects. *International Review of Cytology-Supplement* 11A: 71-111.

- Thorpe, T. A. (1995). *In Vitro* Embryogenesis in Plants. In: Kluwer Academic Publishers. 156-189.
- Tulecke, W. (1987). Somatic embryogenesis in woody perennials. In Cell and tissue culture in forestry (Bonga, J. M. & Durzan, D. J. Eds.). Martinus Nijhoff Publishers, Dordrech, pp 61-91.
- Tutin, T.G. (1964). *Flora europaeae*, vol. 1. Cambridge University Press, London.
- Vasil, I. K. & Thorpe, T A. (1994). *Plant Cell and Tissue Culture*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 17-36.
- Viana, A. M. & Mantell, S. H. (1999). Somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis*: an endangered tree of the mata atlântica (South Brasil). In: Jain, S. M., Gupta, P. K. & Newton, R. J. (Eds.). *Somatic embryogenesis in woody plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht Vol. 5. pp 215-223.
- Viana, A. M., Mazza, M. C. & Mantell, S. H. (1999). Applications of biotechnology for the conservation and sustainable exploitation of plants from Brazilian Rain Forest. In: *Plant conservation biotechnology* (E. Benson, Ed.). University of Abertay, Dundee, pp 277-299.
- von Arnold. (2008). Somatic embryogenesis, In: George, E. F., Hall, M. A. & de Klerck, G-J. (ads). *Plant propagation by tissue culture. The Background*, 3rd Edn. Springer, Dordrecht.
- Wasternack, C. & Hause, B. (2002). Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 72: 165-221.
- Watt, M. P., Blakeway, F., Cresswell, C. F. & Herman, B. (1991). Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis*, South Africa For. 157: 59-65.
- Werff, H. W. & Richter, H. G. (1996). Toward and improved classification of Lauraceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 8: 419-432.
- Williams, E. G. & Maheswaran, G. (1986). Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group, *Annals of Botany* 57: 443-462.

- Witjaksono, Litz, R. E. & Grosser, J. W. (1998). Isolation, culture and regeneration of avocado (*Persea americana* Mill.) protoplasts. *Plant Cell Reports* 18: 235-242.
- Witjaksono. & Lits, R. E. (1999). Induction and growth characteristics of embryogenesis avocado (*Persea Americana* Mill.) Cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 58: 19-29.
- Yang, X. & Zhang, X. (2010). Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Critical Reviews in Plant Science* 29: 36-57.
- Zeevaart, J. A. D. & Creelman, R. A. (1988). Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology* 39: 439-473.
- Zimmerman, J. L. (1993). Somatic Embryogenesis: A Model of Early Development in Higher Plants. *Plant Cell* 5: 1411-1423.