



# DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## Embriogénese somática em genótipos de *Quercus suber* análise bioquímica e histológica de produtos de reserva



Sara Catarina Reis **Rodrigues**

2014



# DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## **Embriogénese somática em génotipos de *Quercus suber*** análise bioquímica e histológica de produtos de reserva

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

**Sara Catarina Reis Rodrigues**

2014

*If you can find a path with no obstacles, it probably doesn't lead anywhere.*

Frank Clark

*“Lá no cimo do montado  
No ponto mais elevado  
Havia um enorme sobreiro  
De todos era a cobiça  
A dar bolota e cortiça  
No montado era o primeiro*

*Mas um dia a tempestade  
Fez ouvir lá na herdade  
O ribombar dum trovão  
E no céu uma faixa risca  
Uma enorme faísca  
Fez o sobreiro em carvão*

*Passaram anos e agora  
No mesmo sítio lá mora  
Um chaparro altaneiro  
E em noites de luar  
Houve-se o montado a chorar  
Com saudades do sobreiro*

*É assim a nossa vida  
Constantemente vivida  
Quase sempre a trabalhar  
Mas se um dia a morte vem  
Nós deixamos sempre alguém  
Com saudades a chorar”*

Fado do Sobreiro,  
Abílio Morais e Alfredo Marceneiro

## Agradecimentos

Nada disto eu teria feito sozinha e, por isso, quero agradecer a todos os que estão por detrás desta dissertação de mestrado.

À Doutora Sandra Correia e ao Professor Doutor Jorge Canhoto pela excelente Coordenação, Ajuda e Ensinamentos; Aos colegas do laboratório de Biotecnologia Vegetal e à D. Eulália Rosa pelo Apoio e troca de informações (um especial agradecimento ao João Martins pela paciência que teve comigo a explicar-me os procedimentos); à Doutora Lúcia Salgueiro e à Dra. Teresa Amaral, sem as quais não teria conseguido desenvolver a parte da quantificação lipídica (aqui também um agradecimento ao Gustavo Costa e à D. Fátima Colaço); aos Professores que me ajudaram a chegar a esta fase.

Aos Professores Mariano Toribio e Jesús Alegre pela cedência de parte do material usado para a realização do meu projeto.

A toda a equipa médica dos Hospitais da Universidade de Coimbra e, em especial, à Doutora Catarina Canha, por me manterem de saúde estável.

À Liliana Cordeiro, à Vera Dias e ao João Alegre pela Amizade, Risos e Desabafos; À minha afilhada Andreia Perinha por toda a Amizade, ao “caloiro” Miguel Dias, e às "pseudos" Ana Carolina Correia, e Catarina Maia pelo especial Apoio; ao pessoal da Inquietação e a todos os outros Amigos e Colegas.

À Filipa Vieira e ao Nuno Cerejeira por serem os “Big Friends” de e para sempre. Nunca arranjarei palavras em condições para lhes agradecer.

Ao Filipe Covelo por todo o Apoio, Ajuda, Compreensão e Amor.

À minha família, mas em especial aos meus Pais e ao meu Irmão pela Força que está por trás da "belota",

A todos, o meu mais sincero Obrigada!

# Índice

Resumo .....	I
Abstract .....	III
1. Introdução .....	1
1.1 Sobreiro ( <i>Quercus suber</i> ).....	3
1.1.1 Caracterização, distribuição e importância económica .....	3
1.1.2 Propagação de <i>Q. suber</i> .....	7
1.1.2.1 Embriogénese somática .....	8
1.1.2.2 Embriogénese somática no sobreiro .....	11
1.1.2.3 Acumulação de compostos de reserva durante a embriogénese.....	14
1.2 Objetivos .....	15
2. Materiais e Métodos.....	16
2.1 Material Vegetal.....	17
2.2 Indução de embriogénese somática e manutenção de culturas embriogénicas .....	17
2.2.1 Manutenção de culturas embriogénicas.....	19
2.2.2 Indução <i>de novo</i> de embriogénese somática em segmentos foliares .....	19
2.3 Desenvolvimento de embriões somáticos em <i>calli</i> previamente induzidos .....	21
2.3.1 Proliferação de calos em meio líquido .....	21
2.3.2 Maturação e conversão dos embriões somáticos .....	22
2.4 Análise histoquímica e bioquímica dos compostos de reserva .....	23
2.4.1 Recolha e conservação do material vegetal .....	23
2.4.2 Extração e quantificação de amido .....	25
2.4.3 Extração e quantificação de lípidos .....	26
2.4.4 Extração, quantificação e separação SDS-PAGE de proteínas .....	27
2.4.4.1 Extração de proteínas .....	27
2.4.4.2 Quantificação de proteínas .....	28
2.4.4.3 Separação das proteínas por SDS-PAGE .....	28
2.4.5 Análises histoquímicas de substâncias de reserva.....	29
2.4.5.1 Fixação, pós-fixação e inclusão.....	29
2.4.5.2 Aspeto geral das células .....	30
2.4.5.3 Detecção de amido .....	30
2.4.5.4 Detecção de lípidos .....	31
2.4.5.5 Detecção de proteínas.....	31

2.5	Análise estatística.....	31
3.	Resultados.....	32
3.1	Indução de embriogênese somática e manutenção de culturas embriogénicas .....	33
3.1.1	Manutenção de culturas embriogénicas.....	33
3.1.2	Indução <i>de novo</i> de embriogênese somática em segmentos foliares .....	36
3.2	Desenvolvimento de embriões somáticos em <i>calli</i> previamente induzidos .....	39
3.2.1	Proliferação de calos em meio líquido .....	39
3.2.2	Maturação e conversão dos embriões somáticos .....	40
3.3	Análise histoquímica e bioquímica dos compostos de reserva .....	41
3.3.1	Quantificação de produtos de reserva e separação SDS-PAGE de proteínas.....	41
3.3.2	Análises histoquímicas de substâncias de reserva .....	45
4.	Discussão .....	50
4.1	Indução de embriogênese somática e manutenção de culturas embriogénicas .....	51
4.2	Análise histoquímica e bioquímica dos compostos de reserva .....	54
5.	Conclusão .....	59
6.	Referências bibliográficas.....	61

## Resumo

*Quercus suber* (sobreiro) é uma planta com um grande interesse económico devido à produção de cortiça, sendo Portugal o principal produtor. A propagação tradicional da espécie por técnicas de multiplicação vegetativa permite assegurar a propagação clonal, mas apresenta fortes limitações, pelo que têm sido desenvolvidos métodos para a propagação do sobreiro utilizando técnicas de cultura *in vitro*. Assim, a embriogénese somática foi induzida nesta espécie a partir de explantes de origem adulta. Primeiramente, calos embriogénicos obtidos num meio rico em auxinas (2,4-D e NAA) e citocininas (KIN e BAP) a partir de folhas obtidas por abrolhamento de estacas de diferentes árvores, foram subcultivados para um meio com menores concentrações de reguladores de crescimento (NAA e BAP), surgindo embriões somáticos em diferentes estádios aquando da cultura num meio sem hormonas. Os embriões somáticos primários têm capacidade de sofrer embriogénese recorrente em meios com NAA e BAP, ocorrendo a sua maturação num meio sem reguladores de crescimento. A combinação de reguladores de crescimento que deu melhores resultados foi 50 µM NAA + 10 µM BAP. Noutros génotipos, para os quais os calos já estavam previamente induzidos de acordo com o mesmo protocolo, obtiveram-se embriões somáticos em quatro estádios de desenvolvimento (desde um estádio precoce globular até um estádio cotiledonar bem desenvolvido), pelo cultivo num meio sem reguladores de crescimento com subculturas feitas a cada 6 semanas, e em condições de 16h luz:8 h escuro. Para compreender melhor o desenvolvimento dos embriões somáticos nesta espécie, analisaram-se bioquímica e histoquimicamente os níveis de compostos de reserva (proteínas, lípidos e amido) nos quatro estádios de desenvolvimento dos embriões, comparando com os valores obtidos para embriões zigóticos (cotilédones e eixos embrionários). Os resultados mostraram que o teor em reservas dos embriões somáticos era sempre inferior ao dos embriões zigóticos. Durante o desenvolvimento dos embriões somáticos o teor de reservas variava em função do estádio de desenvolvimento tendo-se verificado um aumento do teor de amido e proteína, enquanto no caso dos lípidos se verificou um valor constante, sendo o teor particularmente elevado na fase de calo embriogénico. Os perfis proteicos obtidos por SDS-PAGE das várias amostras de embriões somáticos e de eixos embrionários zigóticos mostraram uma maior expressão de determinadas bandas (60 kDa, 46 kDa e 26 kDa) em embriões mais desenvolvidos enquanto outras



apresentavam uma nítida redução (30 kDa, 40 kDa e 50 kDa). Verificou-se ainda que o perfil proteico encontrado em embriões somáticos maduros é semelhante ao perfil proteico originado por embriões zigóticos, embora com algumas diferenças que poderão explicar a dificuldade que os embriões somáticos têm em germinar. Os resultados mostraram ainda ser possível a obtenção de material embriogénico e não embriogénico a partir dos embriões somáticos, situação que permitirá no futuro a realização de estudos de proteómica e genómica entre os dois tipos de calo com o objetivo de identificar fatores envolvidos no controlo da embriogénese somática.

Palavras-chave: calos embriogénicos, embriogénese recorrente, reguladores de crescimento, SDS-PAGE, sobreiro.

## Abstract

*Quercus suber* (cork oak) is a plant with a big economic interest due to the production of cork, Portugal being the main producer. Traditional propagation of this species through vegetative multiplication techniques ensures clonal propagation, although presenting strong limitations. Because of that, in vitro culture techniques have been developed for the propagation of cork oak. Somatic embryogenesis was induced in this species through the culture of explants of adult trees. First, embryogenic calli were obtained on an auxin (2,4-D and NAA) and cytokinin (KIN and BAP) containing medium, from leaves sprouted in the greenhouse. Then they were transferred to media containing lower concentrations of plant growth regulators (NAA and BAP) and then to an auxin-free medium, where somatic embryos appeared. These somatic embryos showed the capacity to develop repetitive embryogenesis in media containing NAA and BAP, with the secondary embryos developing in PGR free media. The best PGR combination for the induction of somatic embryos was 50  $\mu$ M NAA + 10  $\mu$ M BAP. Calli from other genotypes, previously induced with the same protocol, originated somatic embryos which were grouped in 4 different development stages according to their appearance (from a premature with a globular aspect embryo, until a mature embryo stage) when subcultured to PGR free media on 16h:8h light: dark conditions, on 6 weeks intervals. To better understand somatic embryo development in this species, the 4 development stages were biochemically and histochemically analyzed for storage product accumulation (proteins, lipids and starch), and compared with zygotic embryos (cotyledons and embryonary axis). The results showed that reserve compounds in somatic embryos were always lower than in zygotic embryos. During somatic embryo development, reserves changed according to the developmental stage of the somatic embryo, with the starch and protein content being greater on the mature stages, whereas lipid content showed little variation, although being particularly high during the embryogenic calli stage. Protein profiles of the samples obtained with SDS-PAGE showed sets of protein bands (with 60 kDa, 46 kDa and 26 kDa) with an increasing expression throughout the maturation of the embryos, and another sets of protein bands (with 30 kDa, 40 kDa and 50 kDa) with reduced expression throughout the maturation of the somatic embryos. Also, the protein profile obtained in mature somatic embryos was similar to that obtained in zygotic embryos, although with some differences that

may explain the difficulty of the somatic embryos to involve into plantlets. The results also showed that it is possible to obtain embryogenic and non-embryogenic material from somatic embryos. This will permit in the future to do proteomic and genomic comparisons between the two types of calli so that the factors involved on the control of somatic embryogenesis can be identified.

Keywords: cork-oak, embryogenic calli, plant growth regulators, repetitive embryogenesis, SDS-PAGE.

# 1. Introdução



A história da Humanidade confunde-se com a história das próprias plantas, não apenas porque a alimentação humana depende das plantas, mas também por outros produtos que elas oferecem, como sejam a produção de medicamentos ou a confecção de vestuário, por exemplo. No entanto, com o crescimento populacional que se verifica anualmente, projetando a FAO um incremento dos atuais cerca de 7 mil milhões para 10 mil milhões até 2050, o Homem foi obrigado a estudar a melhor forma de rentabilizar a utilização de cada planta, principalmente as mais usadas por si, assim como pensar em maneiras de otimizar o crescimento, produção e resistência a fatores bióticos e abióticos de cada uma. Com o passar dos anos as plantas foram, naturalmente e artificialmente, sofrendo variabilidade o que lhes conferiu modificações profundas a vários níveis. Estas alterações deram-se nos diferentes órgãos das plantas, e originaram todas novas combinações genéticas mais ou menos interessantes que se refletiram em profundas alterações fenotípicas. Moose e Mumm (2008) consideram mesmo que as primeiras seleções de fenótipos mais interessantes podem ser consideradas os primeiros exemplos de biotecnologia em plantas.

Com o desenvolvimento da Biotecnologia Vegetal tornou-se possível manipular as plantas de uma maneira mais eficaz. De facto, existem atualmente protocolos de transformação genética para um grande número de espécies o que, associado à regeneração *in vitro*, permite a clonagem de génotipos de interesse. Por cultura *in vitro* entende-se o estabelecimento e manutenção, em condições laboratoriais, de células, tecidos, órgãos vegetais, plantas ou massas de células, vulgarmente designadas por calos ou *callus* (Chawla, 2009).

À semelhança do que se verifica com muitas outras espécies lenhosas, também o sobreiro (*Quercus suber* L.) tem sido objeto de estudo em ensaios de cultura *in vitro*, em particular no que diz respeito à clonagem. Tratando-se de uma espécie lenhosa, com uma grande longevidade, a utilização de técnicas de propagação *in vitro* é de grande interesse, pois os métodos de clonagem convencionais têm-se revelado pouco eficazes (García-Martín *et al.*, 2005).

No laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Ecologia Funcional do Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra, têm sido, desde há muitos anos, realizados estudos sobre a indução de embriogénese somática em várias espécies lenhosas. Sendo o sobreiro uma espécie com forte importância económica no nosso país, decidiu-se incorporar esta espécie como objeto de estudo relativamente à otimização e caracterização do processo de embriogénese somática. O presente trabalho

é mais uma contribuição para este objetivo mais global de compreensão dos processos de morfogênese *in vitro* em espécies lenhosas.

## **1.1 Sobreiro (*Quercus suber*)**

### **1.1.1 Caracterização, distribuição e importância económica**

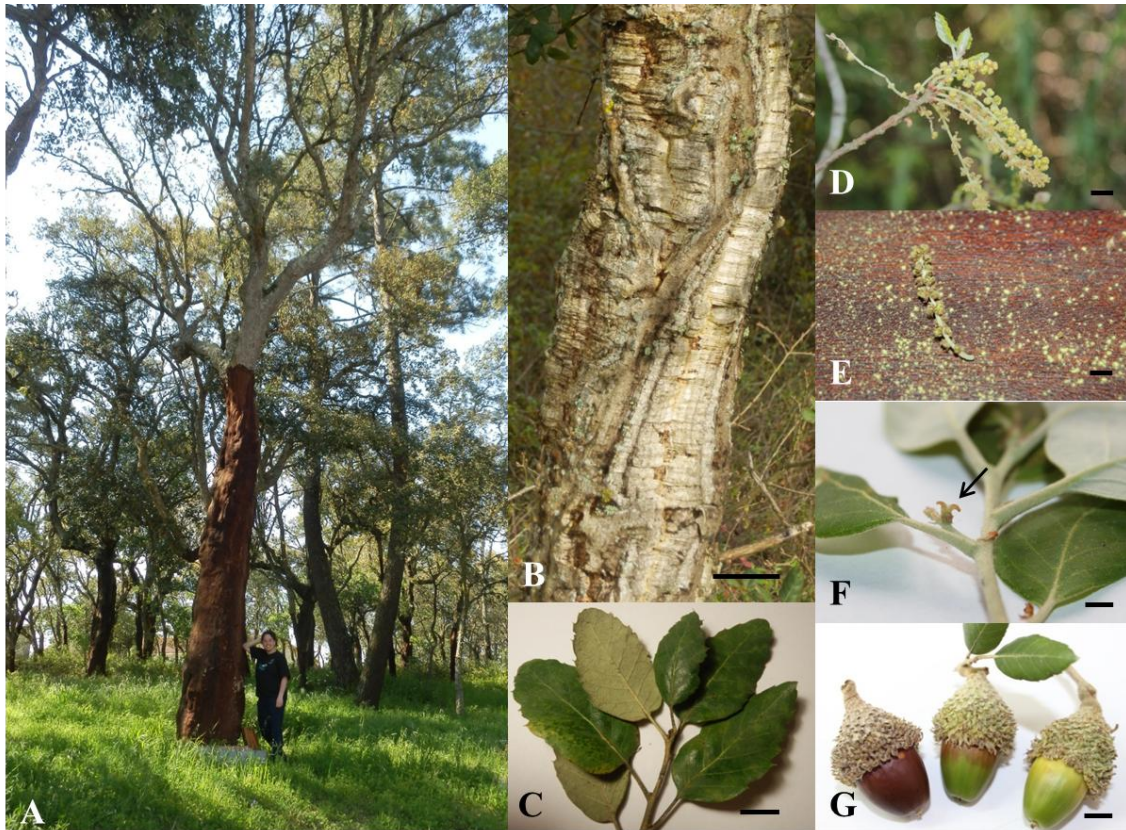
*Quercus suber*, conhecido como sobreiro, é também frequentemente denominado como sobro. São usados outros nomes, em função da idade das plantas, como sobreira (indivíduos com idades superiores a 180 anos), chaparro (indivíduos até 20 anos), chaparreiro ou soveiro. Esta é, desde Fevereiro de 2012, a Árvore Nacional de Portugal, sendo o Dia Nacional do Sobreiro e da Cortiça comemorado a 1 de Junho.

O sobreiro é uma espécie do género *Quercus* e da família Fagaceae, que engloba outras espécies bem conhecidas tais como vários carvalhos (negral, alvarinho), faias e o castanheiro. Nos membros desta família os frutos são monospermiados e apresentam-se em grupos de 1 a 3, envolvidos na base ou na totalidade por uma cúpula geralmente dura, de morfologia variável. Estes frutos são dispersos por animais e as sementes são, por norma, recalcitrantes, com um período de viabilidade reduzido (Heywood *et al.*, 2007).

*Q. suber* é uma espécie arbórea perene com um genoma constituído por 24 cromossomas ( $2n=24$ ). Cada indivíduo chega, normalmente, aos 200-250 anos de idade apresentando-se como uma árvore mediana, robusta e forte, cujo tamanho médio é 10-15 metros, frequentemente até 20 metros (Fig. 1A), com o tronco a alcançar até 2,5 metros de diâmetro (Torres, 1979), dependendo do genótipo e das condições edafo-climáticas. A espécie é explorada para extração de cortiça (Fig. 1B), que não é mais que o súber que protege a árvore, e que resulta de um meristema secundário (câmbio) designado felogénio (Pintus, 1996). As folhas (Fig. 1C) são alternadas, persistentes, simples, com 5-7 pares de nervuras laterais, com um mesófilo dorsiventral achatado e de cor verde escura, glabrescentes e coriáceas na página superior e com um indumento esbranquiçado na página inferior (Gil e Varela, 2008). A planta é monóica e a polinização anemófila, com grande produção de pólen, como se pode observar na figura 1E. As flores masculinas (Fig. 1D) encontram-se em inflorescências longas e pedunculadas (amentos) com 4-8 cm enquanto as flores femininas (Fig. 1F) são solitárias. Os frutos (glandes ou bolotas – Fig. 1G), com 20-45 mm × 10-18 mm estão

protegidos na base por uma cúpula revestida de escamas curtas, e sofrem maturação no próprio ano em que são formadas ou no ano seguinte, podendo a mesma árvore ter frutos em diferentes estados de desenvolvimento (Gil e Varela, 2008). Esta espécie é considerada reflorescente (Natividade, 1990) uma vez que floresce de Abril a Junho mas, em algumas árvores, a floração prolonga-se de tal maneira que se pode considerar subcontínua. Em estações com boas condições o sobreiro começa a frutificar por volta dos 10-12 anos, mas a regularidade da produção de fruto atinge-se apenas aos 25-30 anos (Torres, 1979).

O sobreiro requer uma temperatura média anual que ronda os 13-18 °C e uma precipitação média de 479 mm a 2400 mm, pelo que a sua área de distribuição engloba regiões costeiras a oeste da Bacia do Mediterrâneo, o que inclui a Argélia, França, Itália, Marrocos, Portugal, Espanha, Tunísia, ilhas mediterrânicas como a Córsega, Sardenha e Sicília, e zonas muito restritas nas ilhas Maiorca e Menorca (Alves, 1988). As áreas florestais mais extensas são encontradas na costa atlântica da Península Ibérica, próximas do oceano Atlântico (Gil e Varela, 2008), como se pode observar na figura 2A. Os maiores níveis de diversidade genética foram encontrados em Espanha (Sul e Centro) sugerindo que a Península Ibérica é o centro de diversidade do sobreiro e um refúgio genético para a espécie desde o Mioceno, altura em que terá surgido (Gil e Varela, 2008). Considera-se que o elevado polimorfismo encontrado no sobreiro pode ser atribuído à sua plasticidade fisiológica, que proporciona a esta espécie a adaptação a condições climáticas variáveis e imprevisíveis, características do clima mediterrâneo, onde o fogo ocorre de forma mais frequente e previsível (Elena-Rosselló *et al.*, 1996). Apesar de tudo, a atual área de distribuição do sobreiro não traduz tanto a sua preferência por determinadas condições edafo-climáticas mas, sobretudo, resulta de várias circunstâncias como o fogo, o abuso do pastoreio e a exploração intensiva – note-se o efeito da forte pressão antropomórfica que deixou a sua marca nas populações marginais, causando o seu completo desaparecimento (Bellarosa, 2003).



**Figura 1.** Diferentes aspetos do sobreiro. **A.** Indivíduo com, aproximadamente, 150 anos de idade, após descortiçamento; **B.** Pormenor de um tronco de um indivíduo com cerca de 50 anos de idade para observação do aspeto conferido pela cortiça – este observa-se a partir do sexto ano de crescimento; **C.** Folhas, algumas com a face abaxial (mais clara) virada para cima; **D.** Inflorescência (amentilho) masculina; **E.** Amentilho e pólen; **F.** Flor feminina (seta); **G.** Bolotas em diferentes estados de desenvolvimento. As barras correspondem a 10 cm (B) e 1 cm (C-G).



**Figura 2.** Área de distribuição de *Q. suber*. **A.** Distribuição global sendo notória a predominância nas regiões costeiras a oeste da bacia do Mediterrâneo (Gil e Varela, 2008); **B.** Distribuição em Portugal continental (imagem retirada de [www.infopedia.pt/\\$sobreiro](http://www.infopedia.pt/$sobreiro)).



O sobreiro cresce em sistemas agroflorestais, conhecidos como *Montados*, que se caracterizam por serem áreas florestais abertas, com pouca densidade arbórea (50-300 árvores/ha). Nestes sistemas são cultivadas gramíneas e leguminosas, que são uma fonte de alimentação para o gado durante o verão (Gil e Varela, 2008). Outro tipo de povoamento onde o sobreiro pode existir é o *Sobreiral* que se caracteriza por densidades arbóreas mais elevadas, e que já não permite a consociação com a agricultura, associando-se geralmente a produção de cortiça a outras atividades económicas como sejam a cinegética, silvo-pastorícia e/ou apicultura (Correia e Oliveira, 1999).

Portugal é o país que apresenta a maior área de distribuição desta espécie, podendo ser encontrada na zona centro-sudeste onde tem, no entanto, sofrido fortes contrações tanto por causa da florestação com espécies de rápido crescimento, como pelo desenvolvimento das áreas urbanas (Bellarosa, 2003). O sobreiro é uma espécie que ocorre espontaneamente ou que é cultivada em todo o país (Fig. 2B), ocupando cerca de 23% do território continental de acordo com o último inventário florestal (ICNF, 2013). Apesar de ser a Sul do Tejo que se encontram as maiores manchas de distribuição, o nosso país possui condições para a adaptabilidade do sobreiro, em diversas outras regiões – exemplo disso é a facilidade com que esta árvore regenerou povoamentos em Trás-os-Montes e Alto-Douro só pela simples proteção aos sobreiros jovens provenientes da regeneração natural (Natividade, 1990). Atualmente, grande parte do centro e litoral do Sul de Portugal é ainda dominado por comunidades seminaturais e/ou formações descontínuas de sobreiro, cultivado em regime de montado. É também notório que em zonas onde o sobreiro é comum, a um decréscimo da pressão antropogénica corresponde uma colonização por esta espécie em poucas décadas, facto que pode estar relacionado com a grande variação genética das características de adaptação e à capacidade reprodutiva da espécie (Varela *et al.*, 1995).

O sobreiro é usado, principalmente, para a extração de cortiça. A primeira desbóia (cortiça virgem) é realizada quando a árvore tem cerca de 25 anos de idade. As colheitas seguintes (correspondentes às cortiças secundeira e amadia) podem ser feitas a cada 9-12 anos; no nosso país, geralmente nove. A produção de cortiça depende do diâmetro do tronco da árvore, da frequência das colheitas e do comprimento do tronco e dos ramos que podem sofrer desbóia (Gil e Varela, 2008).

Ao longo do tempo, a cortiça tem sido utilizada com fins diversos, mas a principal utilização foi, e ainda é, o fabrico de rolhas, correspondendo esse valor a cerca

de 66% da cortiça total que é produzida (INE, 2009). Nos últimos anos tem-se assistido a uma diversificação da utilização deste material (Fig. 3). Painéis de isolamento, material para chão e parede, produtos à prova de som para a indústria automóvel, volantes para *badminton*, canas de pesca, dispositivos para a indústria espacial e também para artesanato, usos artísticos e papel de cortiça são algumas das inúmeras aplicações deste material (Gil e Varela, 2008). Os sobreiros de Portugal originam cerca de 50% da cortiça consumida no mundo, seguindo-se a Espanha (25%), França e Itália (5%) - através destes quatro países, a União Europeia alcança a posição de líder na produção, processamento industrial e mercado de cortiça (INE, 2009).



**Figura 3.** Aplicação da cortiça em objetos do dia-a-dia. **A.** Acessórios encontrados em várias lojas de comércio tradicional (exemplos de malas, carteiras, sapatos, terços); **B.** Rolha de garrafa (rolha “Helix” da corticeira Amorim – imagem de [www.amorim.com](http://www.amorim.com)); **C.** Novas sapatilhas Nike Air Force 1 Low Premium iD (imagem de [www.nike.com](http://www.nike.com)).

### 1.1.2 Propagação de *Q. suber*

Tradicionalmente, a propagação de sobreiro tem sido feita através de semente, devido à facilidade com que germina. No entanto, a propagação por semente, embora eficaz, não permite fixar características interessantes. Deste modo, e à semelhança do que tem sido feito com outras espécies, existem técnicas de multiplicação vegetativa que permitem assegurar a propagação clonal (Fernandes, 2012). A amontoa, possível graças à capacidade que as toijas apresentam de produzir rebentos, a enxertia e a estacaria são as técnicas de multiplicação vegetativa mais utilizadas (Roldão *et al.*, 1992). Estas técnicas apresentam, todavia, fortes limitações que se relacionam com a sua baixa eficácia (amontoa), rejeição (enxertia) ou dificuldades de enraizamento (estacaria). Deste modo, têm sido desenvolvidos métodos para a propagação do sobreiro

utilizando técnicas de cultura *in vitro* (Gómez *et al.*, 2009). Existem três estratégias para a micropropagação: regeneração dos rebentos a partir de meristemas caulinares pré-existentes (axilares ou apicais), regeneração a partir de meristemas adventícios (organogênese) e regeneração por embriogênese somática (Chawla, 2002).

### **1.1.2.1 Embriogênese somática**

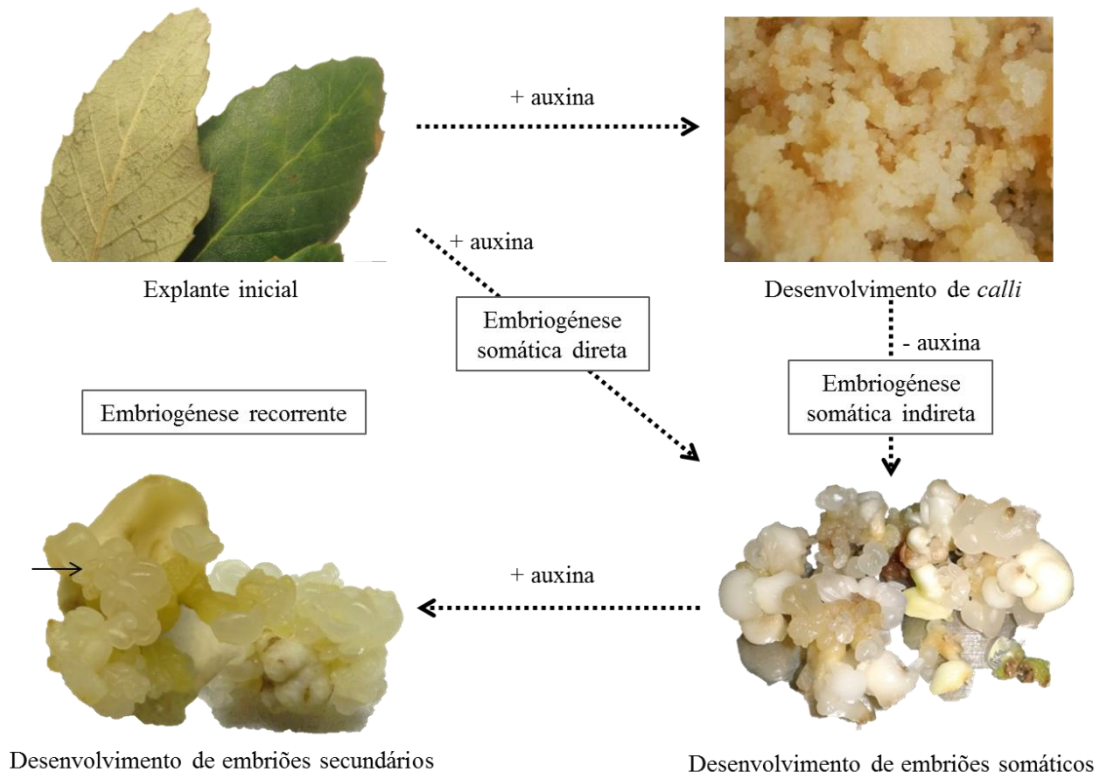
A embriogênese somática consiste na obtenção de embriões morfologicamente semelhantes aos embriões zigóticos a partir de um explante. Os embriões resultantes têm a capacidade de originar novas plantas, que são um clone da planta original (Canhoto, 2010). Foi em 1958 que Steward *et al.* e Reinert descobriram esta forma de clonagem, obtendo embriões somáticos de cenoura, depois de Haberlandt ter definido o conceito de totipotência, em 1902: capacidade que as células (para além do zigoto) possuem de, em determinadas circunstâncias, dividirem e produzirem um novo organismo. No entanto, já antes Levine (1947) tinha obtido plântulas de cenoura a partir de tecidos expostos a baixos níveis de NAA (ácido 1-naftaleno acético), através de um processo cuja descrição é semelhante à embriogênese somática.

Os embriões somáticos, tal como os embriões zigóticos, são estruturas bipolares, com um pólo radicular e um pólo caulinar. No entanto, estes embriões não se desenvolvem envolvidos por outros tecidos do óvulo ou pelo próprio endosperma, podendo ser facilmente analisados. Para além disso, modificações nos meios de cultura, ambiente físico, densidade de culturas e outros fatores químicos exógenos permitem determinar quais as condições mais favoráveis ao desenvolvimento embrionário, uma situação que durante a embriogênese zigótica é difícil.

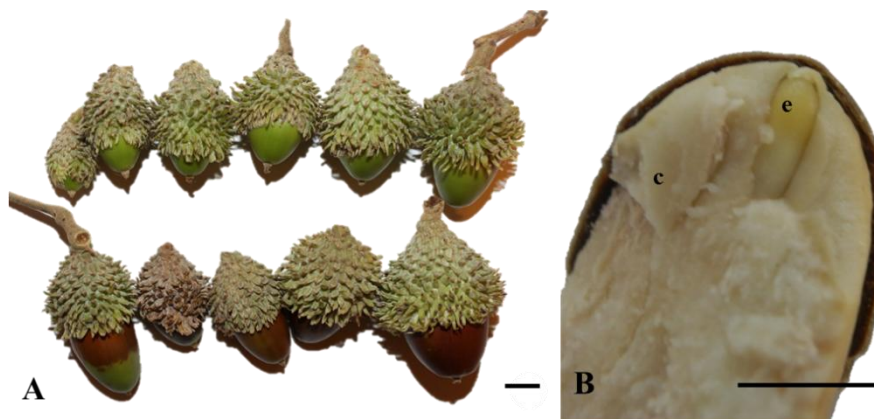
O primeiro passo para o desenvolvimento de um embrião somático é a transição de células somáticas diferenciadas para células que têm a capacidade de formar um embrião (Wilhelm, 2000). Após mitoses sucessivas dessas células desdiferenciadas num meio de cultura com auxina ou sob ação de outras condições de stresse, formam-se massas designadas por massas proembriogénicas. Se estas massas forem fragmentadas e colocadas em meio de cultura fresco, proliferam durante muitas subculturas (Correia, 2011). No entanto, se os fragmentos de calo forem transferidos para um meio de cultura sem qualquer PGR (*Plant Growth Regulator*, regulador de crescimento vegetal), as massas proembriogénicas começam a organizar embriões somáticos (Fig. 4). Ao tipo de embriogênese somática que passa por uma fase de calo indiferenciado (*callus*), chama-

se embriogénese somática indireta (ou “two-step embryogenesis”) e as células que constituem o calo com a capacidade de formar embriões são chamadas “células embriogénicas determinadas por indução” (IEDCs, Sharp *et al.*, 1980). Neste tipo de embriogénese a auxina que promove a formação de células embriogénicamente competentes, inibe o seu desenvolvimento em embriões (Canhoto, 2010). Por outro lado, e mais raramente, pode ocorrer a formação de embriões somáticos diretamente a partir do explante, sem a passagem por fase de calo. A este tipo de embriogénese chama-se embriogénese somática direta e, de acordo com Sharp *et al.* (1980), os embriões apenas podem surgir de células embriogénicas pré-determinadas (PEDCs). Também, em algumas espécies, os embriões somáticos produzidos têm a capacidade de formar embriões secundários, quando, ao meio de indução, se adiciona continuamente um PGR. Ocorre então um fenómeno de embriogénese recorrente, embriogénese secundária ou embriogénese cíclica (Toribio *et al.*, 2005; Fernandes, 2012) – este tipo de embriogénese somática pode manter-se por vários anos, dando origem a um elevado número de plantas (Canhoto, 2010).

Os embriões somáticos passam por várias fases de desenvolvimento que são muito semelhantes àquelas por que passam os embriões zigóticos, apesar de nos últimos estas fases ocorrerem dentro da semente e serem fortemente controladas pela planta mãe (Fig. 5A). Por regra, são consideradas cinco fases: pró-embrião, globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar, que acompanham o desenvolvimento do fruto/semente. Segue-se a maturação, caracterizada pela síntese de substâncias de reserva e a dessecação em que ocorre uma perda considerável de água. Estas fases, muito nítidas durante a embriogénese zigótica, apresentam, por vezes, uma forte variabilidade durante a embriogénese somática, situação a que não será alheia a dificuldade em reproduzir num meio de cultura as condições nutritivas e hormonais a que os embriões estão sujeitos durante o seu desenvolvimento no óvulo/semente (Canhoto, 2010; Fernandes, 2012). No entanto, deve ter-se presente que atendendo ao grande número de espermátófitas, o desenvolvimento embrionário é necessariamente diferente entre diferentes espécies, não apenas ao nível do próprio embrião mas também dos tecidos de reserva associados. Por exemplo, no caso do sobreiro, o embrião maduro é formado por dois grandes cotilédones onde se acumulam as substâncias de reserva e um curto eixo embrionário onde se localizam os meristemas apicais do caule (SAM) e da raiz (RAM), como se pode observar na figura 5B.



**Figura 4.** Esquema resumo dos vários tipos de embriogênese somática. A adição de auxina induz a formação de um calo embriogénico que, ao ser mudado para um meio sem auxina, desenvolve embriões somáticos (embriogénese somática indireta). A adição contínua de auxina ao meio de cultura onde se encontram os embriões somáticos induz a formação de embriões secundários (seta) por um processo de embriogénese recorrente. Embriões somáticos podem também ser induzidos diretamente pela cultura do explante inicial em meio com auxina.



**Figura 5.** Desenvolvimento da bolota em *Quercus suber*. **A.** Várias fases do desenvolvimento; **B.** Secção longitudinal de uma bolota onde é visível o eixo embrionário (e) e o tecido cotiledonar envolvente (c). As barras correspondem a 1 cm.

A embriogénese somática é uma técnica de clonagem *in vitro* que apresenta vantagens quer do ponto de vista da clonagem quer da análise do desenvolvimento embrionário, numa perspetiva mais de ciência fundamental. A principal vantagem é o

facto dos embriões somáticos serem muito semelhantes aos embriões zigóticos da mesma espécie, o que permite estudar o desenvolvimento embrionário da espécie, fazendo variar as condições do meio onde se encontram. Esta é considerada potencialmente a técnica mais importante dos métodos usados na propagação clonal, uma vez que é capaz de originar um grande número de plantas num curto período de tempo e, ao contrário de outras metodologias de micropropagação, não é necessário proceder ao enraizamento, o que encurta também o período de regeneração (Canhoto, 2010). Apesar disso, também são muitas as limitações desta técnica. Embora a técnica tenha já sido aplicada a muitas espécies de angiospérmicas e gimnospérmicas, os mecanismos moleculares que permitem a formação destes embriões ainda não são bem compreendidos. Outras limitações da embriogénese somática passam pela germinação precoce, o elevado número de embriões anómalos, a falta de sincronização das fases durante o desenvolvimento dos embriões, a ocorrência de variação somaclonal e as baixas taxas de conversão (Correia, 2010).

### 1.1.2.2 Embriogénese somática no sobreiro

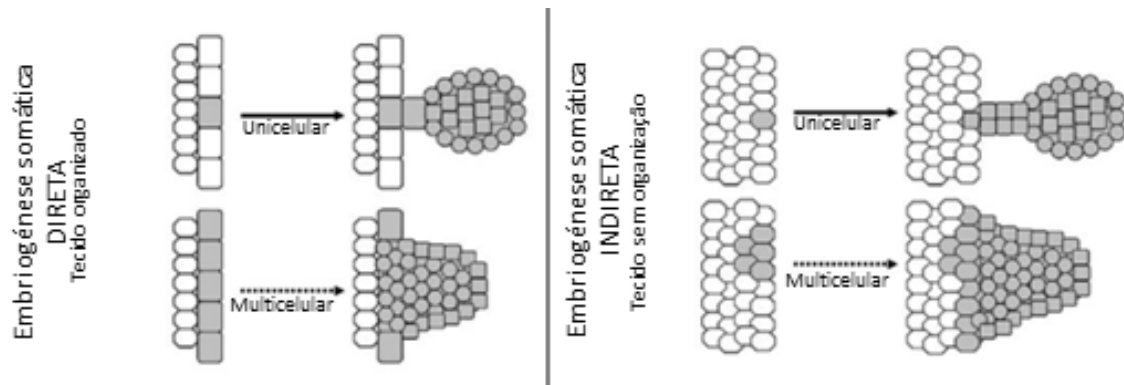
Os primeiros estudos sobre embriogénese somática no género *Quercus* datam de 1982, quando Srivastava e Steinhauer obtiveram embriões somáticos a partir de embriões zigóticos em *Quercus lebanii*. Em *Q. suber* os estudos de embriogénese somática começaram pela cultura de fragmentos cotiledonares de embriões zigóticos maduros (Toribio, 1986; Toribio e Celestino, 1989). Na sequência destes ensaios, foram testados outros explantes como folhas (limbo) e pecíolos de plantas jovens (Fernández-Guijarro *et al.*, 1995), segmentos nodais (El Maâtaoui e Espagnac, 1987; Féraud-Keller *et al.*, 1989), anteras (Bueno *et al.*, 1997) e embriões zigóticos imaturos (Bueno *et al.*, 1992). Dado o sucesso na indução de embriões somáticos a partir de embriões zigóticos, este procedimento tornou-se um método muito utilizado para estudar a embriogénese somática nesta espécie e vários autores realizaram ensaios ulteriores com o objetivo de analisar o efeito da composição do meio de cultura e de combinações de reguladores de crescimento (PGRs) na formação dos embriões somáticos (Manzanera *et al.*, 1993). No entanto, e tendo em conta que a embriogénese somática a partir de embriões zigóticos não permite clonar génotipos selecionados, mas apenas génotipos de interesse desconhecido (Hernández *et al.*, 2003a), também se tentou desenvolver protocolos para

indução de embriões somáticos a partir de plantas adultas (Toribio *et al.*, 1999; Pinto *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2003a, 2003b). Estes trabalhos foram uma contribuição muito importante pois permitiram clonar árvores adultas abrindo assim porta à propagação de genótipos comercialmente importantes.

O estado de desenvolvimento dos explantes é considerado um fator crucial para o sucesso da indução, sendo conhecido que tecidos jovens, como folhas, zonas meristemáticas ou embriões, devido ao seu estado pouco diferenciado são, por norma, mais suscetíveis à indução do que tecidos ou órgãos mais diferenciados, que podem atingir 20% ou menos de sucesso de indução (Wilhelm, 2000). No caso do sobreiro, e como já foi referido, a indução pode ser conseguida a partir de ambos os tipos de explante (Wilhelm, 2000).

Nesta espécie, tal como noutras, os embriões somáticos podem surgir diretamente a partir da superfície do explante (embriogénese somática direta), ou pela formação de um calo – embriogénese somática indireta (Fig. 6). Exemplos de obtenção de embriões somáticos de uma forma direta são os trabalhos de Féraud-Keller *et al.* (1989) quando se cultivou tecido zigótico maduro (os embriões obtiveram-se a partir da superfície cotiledonar dos embriões zigóticos). Noutro caso, em que se obtiveram embriões somáticos a partir da superfície de pecíolos de folhas (Fernández-Guijarro *et al.*, 1995), os autores explicam que os embriões somáticos primários se formam a partir de células que ainda são indiferenciadas e têm a capacidade de formar embriões somáticos.

No entanto, por vezes ocorre embriogénese somática indireta. Neste caso as principais desvantagens residem no tempo que decorre até à obtenção desses mesmos embriões e no facto dos calos de algumas espécies poderem perder potencial embriogénico com o decorrer do tempo (Canhoto, 2010). Exemplos de estudos onde se observou este tipo de embriogénese somática são os trabalhos de Bueno *et al.* (1992) e El Maâtaoui e Espagnac (1987), onde se colocou em cultura tecido maduro e com menos proximidade ao estado embriogénico.



**Figura 6.** Representação esquemática da origem dos embriões na embriogênese somática. O embrião pode surgir diretamente à superfície de um explante (com um tecido organizado) ou pode formar-se indiretamente a partir de um calo (tecido sem organização). Independentemente disso, ele pode ter uma origem unicelular ou multicelular, notando-se que com uma origem multicelular o embrião se funde com o tecido materno pela sua parte basal, enquanto com uma origem unicelular, a conexão entre o embrião e o tecido materno ocorre por uma estrutura parecida a um suspensor (adaptado de Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006).

Nas angiospérmicas, os embriões zigóticos são o resultado da dupla fecundação, tendo uma origem unicelular, a partir do zigoto. A ontogenia dos embriões somáticos é mais complexa, pois podem ter uma origem unicelular ou multicelular (Fig. 6).

Existem várias controvérsias sobre a origem dos embriões somáticos no sobreiro. Segundo estudos histológicos de Puigderrajols *et al.* (1996), a embriogênese somática secundária num meio líquido é normalmente de origem multicelular, fator que depende também do regulador de crescimento utilizado (Williams e Maheswaran, 1986). No entanto os embriões também podem ter uma origem unicelular (El Maâtaoui *et al.*, 1990) e parecem formar-se preferencialmente quando as células embriogénicas se encontram rodeadas por outras células não embriogénicas. Neste caso a massa de células que se forma torna-se castanha e com uma aparência frágil, isolada do tecido à volta (Puigderrajols *et al.*, 1996). Independentemente da via que origina, a via unicelular é preferível no caso de o objetivo ser a clonagem de plantas (Puigderrajols *et al.*, 2001).

A ultra-estrutura da embriogênese secundária no sobreiro através de uma via multicelular (a partir de uma massa compacta) e de uma via unicelular (a partir de células isoladas frágeis e quebradiças) foi estudada por Puigderrajols *et al.* (2001). A comparação das duas vias embriogénicas a um nível ultra-estrutural revelou que as mudanças sub-celulares seguem um padrão sequencial semelhante, com uma forte redução de produtos de reserva.



### **1.1.2.3 Acumulação de compostos de reserva durante a embriogênese**

Após a morfogênese, o embrião passa por uma fase de maturação, durante a qual, como já foi referido, se acumulam substâncias de reserva. Durante a embriogênese zigótica, essas reservas podem acumular-se no embrião, normalmente nos cotilédones, ou no endosperma (sementes endospermicas), e têm a função de fornecer compostos que serão utilizados durante a germinação do embrião até ao início da autotrofia (Pinto *et al.*, 2010). Nos embriões somáticos, este processo de acumulação de reservas é particularmente importante, pois o embrião não tem um endosperma associado. Para além disso, nas espécies em que as reservas, no embrião maduro, se acumulam nos cotilédones, como acontece com o sobreiro, aquelas estruturas são normalmente de dimensões mais pequenas que os cotilédones dos embriões zigóticos correspondentes. Esta situação leva com frequência a deficiências na conversão dos embriões somáticos em plantas, o que limita o sucesso da embriogênese somática (Brownfield *et al.*, 2007).

As reservas metabólicas acumuladas nos embriões são de três tipos: hidratos de carbono (normalmente amido), lípidos e proteínas. Em algumas espécies, metabolitos secundários importantes do ponto de vista ecológico são também acumulados nas sementes/embriões (Raghavan, 2006). Na natureza, sabe-se que o teor dos diferentes compostos de reserva acumulados nas sementes pode variar de espécie para espécie e até entre espécies da mesma família, pois algumas acumulam preferencialmente lípidos e proteínas (como a mamoa) enquanto outras acumulam mais hidratos de carbono (Bewley e Black, 1994). Enquanto os hidratos de carbono e os lípidos são usados como uma fonte de energia e carbono, as proteínas fornecem carbono, azoto e enxofre (Motto *et al.*, 1997). No entanto, não existem muitos estudos sobre a variação dos compostos de reserva durante o desenvolvimento embrionário (Reidiboym-Talleux *et al.*, 2000).

As proteínas são componentes complexos e essenciais a todas as células vivas, sendo as proteínas de reserva armazenadas em corpos proteicos. Nos embriões zigóticos um incremento da concentração de proteína deve-se também à produção das chamadas proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*), as quais são conhecidas por proteger a semente na fase de desidratação, para ulterior preparação da germinação (Wise e Tunnacliffe, 2004). Os lípidos são armazenados em organelos específicos conhecidos como oleossomas (ou gotas lipídicas), com 0,2-6 µm de diâmetro (Isewaki, 2010), e a sua acumulação é induzida pela desidratação da semente que ocorre durante a aquisição da maturação em algumas espécies, como *Prunus avium* (Reidiboym-Talleux *et al.*,

2000). Durante a germinação das sementes estes não podem ser usados sem antes serem convertidos por lípases em compostos mais simples. Esta conversão liberta energia que é usada para a germinação (Filho, 2005). Deste modo, admite-se que os triglicéridos (forma de lípidos de reserva) sejam também importantes durante o desenvolvimento de embriões somáticos (Feirer *et al.*, 1989). O amido é um importante polissacarídeo e é a forma mais comum de reserva de hidratos de carbono nas plantas, abundantemente encontrado em raízes, frutos e outros órgãos, armazenado em amiloplastos (Correia, 2010). Devido às múltiplas funções que desempenham nas células, incluindo transporte, fornecimento de energia e carbono e regulação do potencial osmótico e da expressão génica, o metabolismo dos hidratos de carbono solúveis representa um dos mais importantes processos no ciclo celular (Carrier *et al.*, 1999). Em particular, esses compostos parecem agir na proteção das células embrionárias durante a dessecação, substituindo a água na manutenção de estruturas hidrofílicas, evitando a formação de cristais intra e intercelulares (Bartos, 2012).

## **1.2 Objetivos**

O objetivo deste trabalho foi analisar a acumulação de compostos de reserva, através de análises bioquímicas e histoquímicas, durante a embriogénese somática em sobreiro. Para a realização deste trabalho partiu-se de uma linha embriogénica de sobreiro previamente obtida e mantida por embriogénese recorrente. O protocolo utilizado para a obtenção desta linha com génotipos de origem espanhola foi testado em génotipos portugueses de forma a obter material com menos tempo de cultura e de forma a comprovar a sua eficácia num número mais alargado de génotipos.

Pretendeu-se também criar as condições para obtenção de calos embriogénicos e não embriogénicos com o mesmo background genético de maneira a que se possam realizar, no futuro, ensaios comparativos entre os perfis de macromoléculas dos dois tipos de calos. Uma primeira abordagem a este processo foi realizada pela análise dos perfis de proteína de embriões em diferentes fases de desenvolvimento por SDS-PAGE.

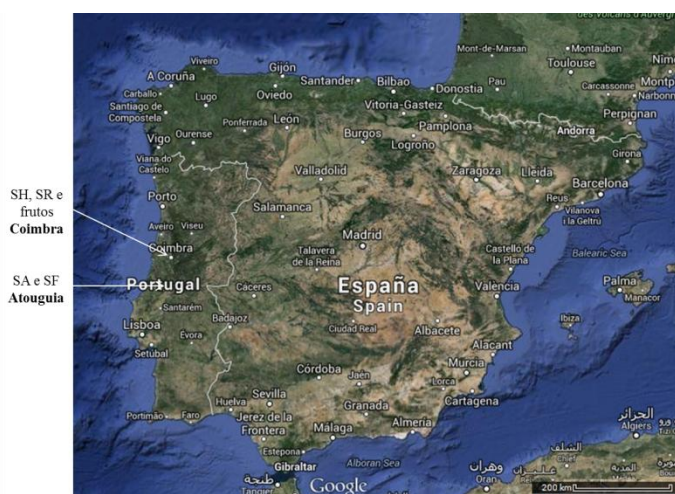
Uma vez que a acumulação de reservas é uma fase crucial do processo de regeneração de plantas por embriogénese somática, o estudo da acumulação de reservas nos embriões somáticos em diferentes fases de desenvolvimento e em comparação com embriões zigóticos, pode fornecer dados importantes que permitam aumentar a eficácia da embriogénese somática no sobreiro.

## **2. Materiais e Métodos**



## 2.1 Material Vegetal

Utilizou-se material vegetal proveniente de 6 genótipos diferentes. Os genótipos TRG3 e G80 foram gentilmente cedidos pela Universidade de Alcalá de Henares. Este material vegetal já estava estabelecido *in vitro* na forma de culturas embriogénicas (ver secção 2.2.1). Os genótipos SH e SR correspondem a duas árvores localizadas em Coimbra e os genótipos SA e SF a duas árvores provenientes de Atouguia, concelho de Ourém (Fig. 7). Ramos destas árvores foram estimulados a abrolhar como se indica na secção 2.2.2. Nestes quatro genótipos (SH, SR, SA e SF) a embriogénese foi induzida *de novo*.



**Figura 7.** Indicação dos locais onde foi recolhido o material vegetal.

Os frutos utilizados para isolamento dos tecidos embrionários testados nos ensaios histológicos e bioquímicos foram recolhidos em Torres do Mondego, Coimbra, em Dezembro de 2013 e mantidos no escuro, a 4 °C durante 4 dias até à realização dos ensaios.

## 2.2 Indução de embriogénese somática e manutenção de culturas embriogénicas

Para obtenção de material embriogénico a partir dos genótipos portugueses, utilizou-se o protocolo desenvolvido por Hernández *et al.* (2003a). Os genótipos TRG3 e G80 foram também obtidos seguindo a metodologia descrita neste artigo. Um esquema do procedimento experimental adotado está representado na figura 8.

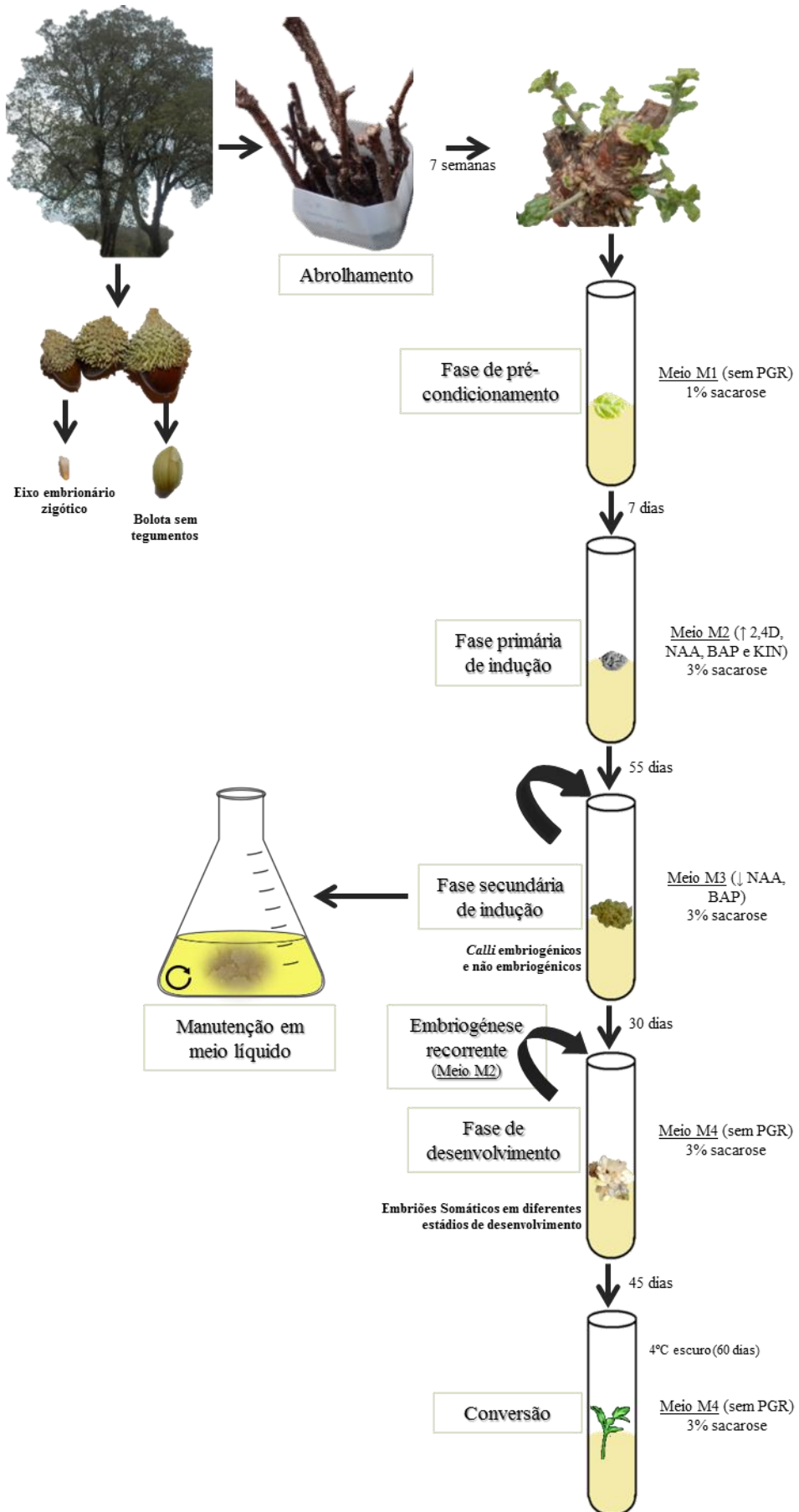


Figura 8. Esquema resumo do protocolo seguido na indução de embriogênese somática em *Q. suber*.

### **2.2.1 Manutenção de culturas embriogénicas**

Culturas embriogénicas de sobreiro dos génotipos TRG3 e G80 foram mantidas em frascos de cultura de vidro (5 cm diâmetro, 7 cm altura), com cerca de 10 ml de meio de cultura M4 (Tabela 1), com os macronutrientes de SH (Schenk e Hildebrandt, 1972), micronutrientes, Fe-EDTA, mio-inositol e vitaminas de MS (Murashige e Skoog, 1962), 30 g/l de sacarose, 6 g/l de agar (Panreac), sem reguladores de crescimento (PGRs) e pH 5,7-5,8. Estas foram obtidas a partir de segmentos foliares e subcultivadas no mesmo meio após períodos de 6 semanas, de acordo com o protocolo descrito em Hernández *et al.* (2003a). Deste modo, massas embriogénicas foram transferidas para tubos de ensaio com o mesmo meio de cultura (M4), esterilizados por autoclavagem a 121 °C, 1,1 atm, durante 20 minutos. As culturas foram mantidas numa estufa, a 24±1 °C, no escuro.

A partir deste material embriogénico inicial foram selecionados calos embriogénicos (CE) e calos não embriogénicos (CNE). A distinção foi feita com base no aspeto morfológico dos calos, apresentando-se os primeiros mais opacos, com estruturas mais coesas e mais amareladas e os segundos com aspeto esbranquiçado e friável. A análise morfológica foi complementada com uma análise citológica em que pequenas porções dos calos foram esmagadas numa lâmina de microscópio, utilizando como corante orceína acética a 2%. A confirmação da natureza dos calos ocorreu pela sua transferência para condições de 16h luz (15-20  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e 8h escuro em meio M4.

### **2.2.2 Indução *de novo* de embriogénese somática em segmentos foliares**

Ramos dos génotipos SH, SR, SA e SF foram recolhidos e transferidos para o laboratório. Após remoção das folhas e dos raminhos laterais, os ramos foram seccionados em estacas com cerca de 15-20 cm e com um diâmetro de 1-4 cm. Procedeu-se à sua lavagem em água corrente, a que se seguiu um tratamento com lixívia comercial a 20% (v/v) durante 15 minutos. As estacas foram em seguida tratadas durante 30 minutos com uma solução (2 g/l) contendo o fungicida Mancozebe ou Milraz em que os componentes ativos são, respetivamente, o mancozebe e o propinebe e o cimoxanil. Após uma lavagem em água corrente, as estacas foram colocadas em vasos com terra húmida, pulverizadas com fungicida e colocadas em estufa a 25 °C sob

fotoperíodo natural (em abril para SH, SR e SA, em novembro para SH2 e SF). De dois em dois dias, e durante 7 semanas, as estacas foram vaporizadas com fungicida Mancozebe (2 g/l) e a terra mantida sempre húmida. No final deste período, as folhas resultantes do abrolhamento iniciado em abril, com 0,5-1,5 cm de comprimento, foram removidas e utilizadas para indução de embriogénese secundária (no ensaio de novembro não se obtiveram folhas).

As folhas foram desinfetadas com etanol a 70% (v/v) durante 30 segundos, a que se seguiu uma desinfeção (10 min.) com hipoclorito de cálcio 2,5%, contendo 2-3 gotas de Tween 20. Após este tratamento as folhas foram lavadas três vezes com água esterilizada. Após desinfeção, as folhas foram transferidas para tubos de ensaio com cerca de 15 ml de meio de cultura (1 folha por tubo), com a página abaxial (inferior) em contacto com o meio, e colocadas no escuro a  $24 \pm 1$  °C. O meio utilizado na primeira fase da cultura (7 dias) foi designado meio M1 e era constituído pelos macronutrientes do meio B5 (Gamborg, 1966) diluídos a metade, e os restantes nutrientes do meio MS, com 10 g/l sacarose e 6 g/l agar, de acordo com o procedimento descrito por Hernández *et al.* (2003a). Após este período inicial, as folhas foram transferidas para o meio 2 (M2) onde permaneceram durante 55 dias. O meio base usado nesta base foi idêntico ao meio M1, mas com os macronutrientes de SH e com 30 g/l sacarose, tendo-se testado combinações das auxinas NAA (ácido 1-naftaleno acético) e 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e das citocininas BAP (6-benzilaminopurina) e KIN (cinetina) conforme se indica na tabela 1. No final desta fase, os calos formados transferiram-se para o meio M3 com a mesma constituição do meio M2, mas com menor concentração de auxina e citocinina. Esta fase do processo decorreu durante 30 dias, após os quais os calos foram transferidos para o meio M4, idêntico ao M3, mas sem PGRs e sob um fotoperíodo de 16h de luz ( $15-20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e 8h escuro. É neste meio que os embriões somáticos se formam a partir dos calos embriogénicos induzidos nas fases anteriores. Novos ciclos de embriogénese (recorrente ou repetitiva) foram iniciados quando se transferiram os embriões para meio M2 com o conjunto A de PGRs, como indicado na tabela 1 (tratamento escolhido segundo a eficácia na indução de embriões somáticos, avaliado com a realização de uma ANOVA de uma via). Como se referiu anteriormente, os tubos de ensaio contendo os meios de cultura foram autoclavados a 121 °C, 1,1 atm, durante 20 minutos.

**Tabela 1.** Composição dos diferentes meios de cultura usados na indução de embriogénese somática em folhas.

		<b>Meio de cultura</b>				
		<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>	
<b>Composição do meio de cultura</b>	Macronutrientes	B5/2	SH	SH	SH	
	Micronutrientes					
	Vitaminas	MS	MS	MS	MS	
	Mio-inositol					
	Fe-EDTA					
	Sacarose	10 g/l	30 g/l	30 g/l	30 g/l	
	Reguladores de crescimento			A. 50µM NAA +10µM BAP		
				B. 50µM NAA +9µM KIN		
			-	C. 4,5µM 2,4-D +9µM KIN	E. 0,5µM NAA +0,5µM BAP	-
				D. 4,5µM 2,4-D +10µM BAP		
Agar	6 g/l	6 g/l	6 g/l	6 g/l		
pH	5,7-5,8	5,7-5,8	5,7-5,8	5,7-5,8		
<b>Condições de Cultura</b>	Tempo entre subculturas	7 dias	55 dias	30 dias	6 semanas	
	Temperatura	24±1 °C	24±1 °C	24±1 °C	24±1 °C	
	Condições de Luz	Escuro	Escuro	Escuro	16h luz: 8h escuro	

## **2.3 Desenvolvimento de embriões somáticos em *calli* previamente induzidos**

Calos previamente induzidos (genótipos TRG3 e G80), e mantidos em meio de cultura M4, foram subcultivados com o objetivo de obter massas proembriogénicas em grande quantidade e, posteriormente, induzir a formação de embriões somáticos, como se indica nas secções seguintes.

### **2.3.1 Proliferação de calos em meio líquido**

Calos dos genótipos TRG3 e G80 mantidos em meio M4 foram transferidos para meio líquido com o objetivo de analisar a sua capacidade de crescimento nestas condições. Neste caso utilizou-se como meio base o meio M4, sem reguladores de crescimento. Estes meios foram esterilizados da mesma maneira que os meios referidos nas secções anteriores e o pH ajustado para 5,7-5,8. Cerca de 250-450 mg de calo foram



transferidos para balões Erlenmeyer de 100 ml contendo 50 ml de meio (Jiménez *et al.*, 2011). Os frascos foram colocados numa incubadora com agitação orbital, a 80 rpm, sob a iluminação de uma lâmpada de 8W, durante 9 horas por dia. Após 5 semanas de cultura as massas embriogênicas foram divididas por tamanho conforme o protocolo de Jiménez *et al.* (2013). Essas massas foram filtradas utilizando filtros de nylon com malha de 1000 µm e filtros de aço inoxidável com uma malha de 400 µm (Sigma S0770), obtendo-se assim três frações correspondentes a agregados celulares de dimensões inferiores a 400 µm, agregados compreendidos entre 400-1000 µm e agregados superiores a 1000 µm (Fig. 10). Estas frações foram cultivadas separadamente nas mesmas condições de cultura, de forma a determinar qual a população com maior crescimento celular.



**Figura 9.** Filtros de 400 µm (direita) e de 1000 µm (esquerda) para divisão dos agregados de massas em cultura em suspensão de acordo com os tamanhos: inferior a 400, 400-1000 e superiores a 1000 µm.

Após 8 meses de cultura na forma de suspensão, transferiram-se as massas, com filtração, para meio agarizado M4 (tabela 1), sem reguladores de crescimento e sob um fotoperíodo de 16 h luz ( $15-20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e 8h escuro. Esta transferência deu-se para diferenciação e separação dos calos embriogênicos e não embriogênicos, e realizou-se com e sem recurso a vácuo.

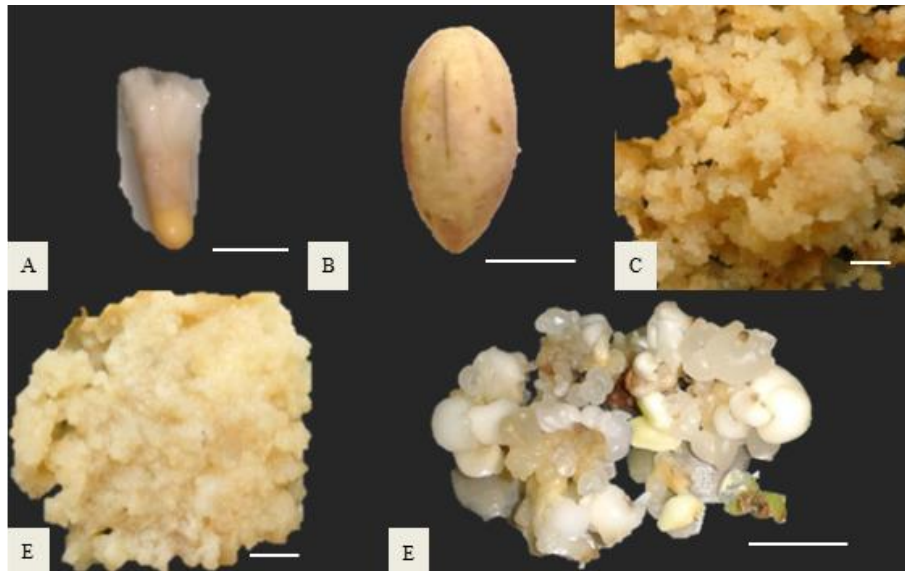
### **2.3.2 Maturação e conversão dos embriões somáticos**

Embriões somáticos do genótipo TRG3 foram colocados em meio de cultura M4 em condições de escuro e a 4 °C durante 60 dias. Depois deste período os embriões foram transferidos para condições de 16h luz:8h escuro até à germinação (Hernández *et al.*, 2003b).

Para a promoção da maturação dos embriões, 30 tubos com embriões somáticos do genótipo TRG3 foram repicados para um meio que se designou de meio M5, idêntico ao meio M4 mas com a adição de 1  $\mu\text{M}$  de ABA (ácido abscísico), e colocados sob um fotoperíodo de 16h luz ( $15\text{-}20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e 8h escuro.

## 2.4 Análise histoquímica e bioquímica dos compostos de reserva

O teor de amido, proteínas e lípidos de calos embriogénicos e não embriogénicos e embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento (Fig. 10) foi comparado com o teor de reservas em embriões zigóticos.

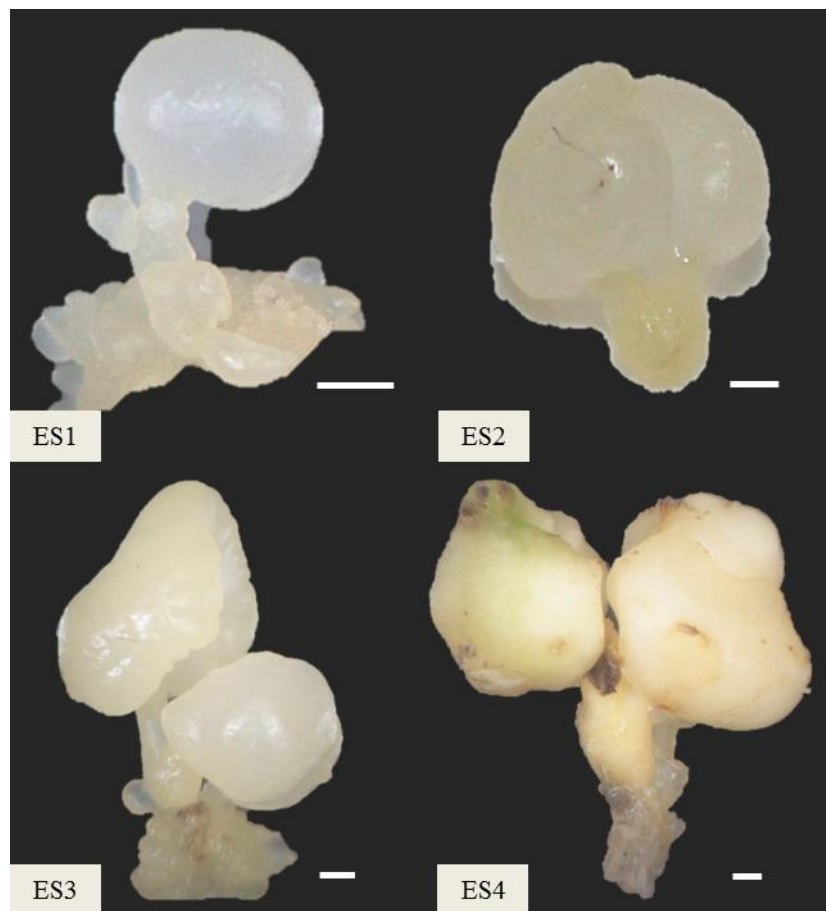


**Figura 10.** Diferentes tipos de materiais utilizados na análise de substâncias de reserva. **A.** Eixo embrionário zigótico; **B.** Fragmentos cotiledonares de bolotas; **C.** Calo embriogénico; **D.** Calo não embriogénico; **E.** Embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento. As barras correspondem a 0,5 cm (A) e a 1 cm (B-E).

### 2.4.1 Recolha e conservação do material vegetal

Para as análises bioquímicas, os calos embriogénicos e os calos não embriogénicos (genótipos TRG3 e G80) foram congelados à medida que foram sendo obtidos. Deste modo, alíquotas de 500 mg (peso fresco) foram revestidas em papel de alumínio, mergulhadas em azoto líquido e colocadas  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  até à análise dos produtos de reserva. Embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento obtidos a

partir de calos embriogênicos dos genótipos TRG3 e SR também foram congelados utilizando o mesmo procedimento. Os embriões foram agrupados em 4 estádios de desenvolvimento, nomeadamente: ES1 corresponde a embriões translúcidos, globulares, com cerca de 2 mm de diâmetro; ES2 corresponde a embriões alongados, com 5-7 mm de comprimento e menos translúcidos que na fase anterior; ES3 com embriões no estágio cotiledonar, de coloração esbranquiçada e com um tamanho até 10 mm e ES4 embriões opacos e com mais de 1 cm de comprimento. As diferentes fases podem ser observadas na figura 11.



**Figura 11.** Diferentes estádios de desenvolvimento de embriões somáticos, para preservação a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , antes da análise dos produtos de reserva (genótipo TRG3). As barras correspondem a 1 mm.

No caso dos embriões zigóticos, os eixos embrionários foram extraídos da bolota com o auxílio de um bisturi. Alíquotas com cerca de 100 mg (5 eixos embrionários) foram processadas como referido para os embriões somáticos. No caso dos cotilédones, removeu-se o pericarpo e o tegumento da semente e aqueles foram segmentados em

pedaços de maneira a obter alíquotas com cerca de 4 g. A conservação foi feita, tal como nos casos anteriores, a -80 °C.

Para análises histológicas usaram-se eixos embrionários frescos, fixados logo de seguida à sua remoção do interior da bolota. Os embriões somáticos em diferentes estádios foram retirados diretamente do meio de cultura para a mistura fixadora.

Os procedimentos adotados para a análise de cada tipo de composto de reserva são indicados nas próximas secções.

#### **2.4.2 Extração e quantificação de amido**

Nesta secção foram usadas amostras de calos embriogénicos e não embriogénicos dos génotipos TRG3 e G80 (500 mg), embriões somáticos do génotipo SR (induzidos com NAA + KIN) no estádio 4 (100 mg), embriões somáticos do génotipo TRG3 nos 4 estádios de desenvolvimento (350 mg), fragmentos cotiledonares de embriões zigóticos (1 g) e eixos embrionários (100 mg).

Para a extração, quantificação e comparação dos valores de amido adotou-se um protocolo adaptado de Hansen e Moller (1975). As amostras (em triplicado) foram maceradas em azoto líquido e, de seguida, procedeu-se à extração dos pigmentos de interferência com uma lavagem com acetona (99%) e centrifugação das amostras durante 10 minutos a 4000 rpm, com eliminação do sobrenadante. Ao *pellet* foram adicionadas duas alíquotas de 2,5 ml de etanol 80% seguidas de duas centrifugações (4000 rpm durante 10 minutos) para extração dos açúcares solúveis (AS) localizados no sobrenadante. Ao *pellet* resultante adicionaram-se 5 ml de HCl 1,1% e colocou-se em banho-maria a 100 °C durante 30 minutos. Após uma centrifugação a 4000 rpm durante 10 minutos e remoção do *pellet*, adicionou-se água destilada até perfazer 10 ml em cada amostra. Esta solução contém amido hidrolisado em monómeros (AM). As soluções para análise de açúcares solúveis e amido hidrolisado em monómeros foram guardadas a -20 °C até à quantificação por espectrofotometria.

A análise espectrofotométrica foi feita com base numa curva padrão preparada com soluções de glucose com as seguintes concentrações: 0, 20, 40, 60, 80 e 100 mg/100 ml. Transferiu-se 1 ml de cada amostra (AM ou AS) e de cada solução padrão para tubos Falcon (15 ml) e colocou-se o suporte em gelo. A cada tubo adicionou-se 2

ml de uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72%. Taparam-se os tubos e agitou-se brevemente no vortex (obtenção de um composto de nome Furfural). Foram em seguida adicionados 4 ml da solução de antrona a cada tubo (0,5 g antrona dissolvidos em 10 ml de etanol a 96%, posteriormente dissolvidos em 250 ml solução H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72%). Os tubos foram colocados em banho-maria a 100 °C durante 11 min. O suporte foi rapidamente retirado e arrefecido num banho de gelo. Ao fim de 15 minutos, analisou-se a absorvância de cada amostra a 630 nm (3 leituras por amostra). Os valores de concentração de açúcares solúveis de cada amostra foram extrapolados a partir da curva padrão. Para determinação da concentração de amido de cada amostra, multiplicou-se o valor da concentração de glucose de cada amostra por um factor de 0,9 (Hodge e Hofreiter, 1962).

### **2.4.3 Extração e quantificação de lípidos**

Neste procedimento foram usadas amostras de calo embriogénico do genótipo TRG3 (1,6 mg), embriões somáticos do genótipo TRG3 nos quatro estádios de desenvolvimento considerados (5 mg cada estádio) e fragmentos cotiledonares de embriões zigóticos (2 mg) – valores de peso seco.

As amostras foram liofilizadas durante 30 horas e todos os tratamentos subsequentes foram feitos com base no seu peso seco. A extração seguiu o procedimento de Folch *et al.* (1957) com clorofórmio:metanol (2:1; v/v) como solvente de extração. Para cada amostra foram realizadas três extrações (n=3).

As amostras liofilizadas foram homogeneizadas em 7 ml de solvente de extração, seguindo-se um repouso de 2 horas (com agitação a cada 30 min). De seguida fez-se uma centrifugação a 4140 rpm durante 10 min. Transferiu-se 5 ml do *pellet* de lípidos para um tubo com 1 ml de NaCl 0,9%, agitou-se durante 1 minuto e voltou a centrifugar-se durante 10 min a 4140 rpm para separação das fases. O sobrenadante foi removido e as paredes do tubo foram lavadas duas vezes com alíquotas de 1 ml de clorofórmio:metanol:água (3:48:47; v/v/v) sendo a solução de lavagem removida. Transferiu-se depois o *pellet* para tubos do Multivapor e as amostras foram evaporadas em condições de vácuo, a 45 °C, durante cerca de 50 minutos. O resíduo foi transferido para um pequeno frasco de vidro, dissolvido em 2 ml de clorofórmio e o solvente foi novamente evaporado em condições de vácuo a 45 °C numa estufa de vácuo durante cerca de 1 hora. O último *pellet* foi dissolvido em 1 ml de clorofórmio e mantido a -20

°C até à realização das análises espectralométricas. Por cada série de extrações foram feitos dois brancos.

A quantificação de lípidos totais foi realizada segundo a reação dos produtos de degradação dos lípidos com aldeídos aromáticos, o que resulta numa coloração vermelha, que pode ser quantificada a 528 nm (Zöllner e Kirsch, 1962).

Colocou-se 100 µl do extrato de cada amostra (e dos brancos) em tubos de 12 ml, evaporando o solvente na estufa de vácuo a 45 °C. Adicionou-se 200 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a cada tubo e agitou-se no vortex. De seguida, as amostras foram colocadas em banho-maria a 100 °C, durante 10 min e arrefecidas num segundo banho-maria a 20 °C durante 5 minutos. Adicionou-se no fim 2,5 ml vanilina-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (20 ml de solução de vanilina a 0.6% com ácido fosfórico a 85% até perfazer 100 ml de solução) e agitou-se no vortex. Após 60-65 minutos mediu-se a absorvância a 528 nm. O conteúdo lipídico de cada amostra foi calculado em equivalentes de colesterol segundo a equação da reta resultante da curva padrão. A curva padrão foi feita utilizando soluções de colesterol de concentrações conhecidas: 0,1; 0,25; 0,4; 0,55; 0,70; 0,85 e 1 mg/ml. Os valores de concentração lipídica obtidos para o peso seco de cada amostra foram convertidos para o equivalente em peso fresco de cada uma.

#### **2.4.4 Extração, quantificação e separação SDS-PAGE de proteínas**

Nesta fase foram usadas amostras de calo embriogénico e calo não embriogénico dos genótipos TRG3 e G80 (~500 mg), embriões somáticos do genótipo TRG3 nos quatro estádios de desenvolvimento considerados (~500 mg cada estádio) e eixos embrionários (~100 mg).

##### **2.4.4.1 Extração de proteínas**

Para extração de proteína total adotou-se um protocolo modificado (Correia *et al.*, 2012a) a partir do método de Zhang *et al.* (2009), tendo-se feito três réplicas por amostra.

As amostras foram maceradas em azoto líquido e homogeneizadas em 4 ml de acetona com TCA 10% (ácido tricloroacético) e DTT 0,2% (ditiotreitól). A suspensão obtida foi dividida por 2 eppendorfs de 1,5 ml e estes armazenados durante a noite a -20 °C. Seguiu-se uma centrifugação a 4 °C durante 30 min. a 13200 rpm, eliminando-se o

sobrenadante. O *pellet* foi lavado 2x em acetona com DTT 0,2% e, em seguida, as amostras foram incubadas durante 30 minutos a -20 °C, até se proceder a nova centrifugação durante 30 min a 13200 rpm (4 °C). Os tubos foram depois transferidos para uma câmara de fluxo laminar e deixados abertos durante cerca de 30 minutos para permitir a secagem completa do *pellet*. Este foi solubilizado em 500 µl de tampão de solubilização com 7M ureia, 2M tioureia, 2% CHAPS (3[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-propanesulfonic acid) e 1% DTT. No final, as amostras foram colocadas num agitador rotativo durante 2h a que se seguiu uma nova centrifugação (13200 rpm, 30 min, 20 °C). Os dois sobrenadantes de cada amostra foram misturados num mesmo eppendorf e armazenados a -20 °C.

#### **2.4.4.2 Quantificação de proteínas**

A quantificação de proteínas totais foi feita de acordo com o método de Bradford (Bradford, 1976) modificado para extratos obtidos na presença de elevadas concentrações de ureia, CHAPS e DTT. Uma curva padrão foi preparada utilizando soluções de BSA (albumina sérica bovina, Sigma) nas concentrações de 0; 0,016; 0,031; 0,063; 0,125; 0,250; 0,500 e 1,000 mg/ml. As amostras a analisar foram diluídas por fatores de 10 utilizando o tampão de solubilização. Às amostras e às soluções padrão foram adicionados 300 µl de uma solução contendo o reagente de Quick Start™ Bradford (Bio-Rad) e água MiliQ na proporção de 1:4. Após um período de incubação de 15 min. à temperatura ambiente, leu-se a absorvância a 595 nm extrapolando-se a quantidade de proteína de cada amostra a partir da curva padrão.

#### **2.4.4.3 Separação das proteínas por SDS-PAGE**

Num eppendorf adicionou-se um volume de cada amostra (em µl) correspondente a 40 µg adicionando-se a solução do tampão de solubilização até perfazer 90 µl. A esta mistura adicionou-se 10 µl de SDS (dodecil sulfato de sódio) (20%) e 2 µl de azul de bromofenol (1%). Os eppendorfs correspondentes às diferentes amostras foram colocados numa placa de aquecimento, a 95 °C, durante 10 minutos para desnaturação das proteínas. Os géis para separação das proteínas foram preparados de acordo com a tabela 2, contendo água destilada, Tris-HCl, Bis-acrilamida, SDS, AMPS (persulfato de amónio) e TEMED (tetrametiletlenodiamina).

**Tabela 2.** Composição dos dois géis que compõem o gel de SDS-PAGE para separação das proteínas.

Running gel (12,5%)	Stacking gel (4%)
H2O destilada	H2O destilada
1,5 M Tris-HCl (pH 8.8)	0,625 M Tris-HCl (pH 6,5)
40% Bis-acrilameida	40% Bis-acrilameida
20% SDS	20% SDS
10% AMPS	10% AMPS
TEMED	TEMED

Seguidamente adicionou-se o tampão de eletroforese (Tris 1M, glicina 1M e 100 ml SDS a 20%) e as amostras foram corridas a 120 V durante cerca de 120 minutos.

Começou-se por correr géis com as três réplicas de cada amostra para estudar a homogeneidade de perfis proteicos entre as réplicas de cada amostra (carregou-se 40 µl, correspondentes a cerca de 16 µg, de calo embrionário, dos 4 estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos e de eixos embrionários). Depois, para comparação dos perfis proteicos ao longo do desenvolvimento embrionário e para comparar com os embriões zigóticos correu-se outro gel com uma réplica de cada amostra escolhida aleatoriamente.

Os géis foram corados com uma solução de azul de Coomassie (para 1L: 2,5g de azul de Coomassie R-250, 450ml metanol, 450 ml H<sub>2</sub>O destilada e 100 ml de ácido acético glacial) sob agitação, durante 5 minutos. Após eliminação da solução corante, os géis foram lavados com água destilada e, em seguida, com uma solução descorante (25% metanol e 5% ácido acético) também sob agitação. O procedimento repetiu-se até obter uma boa descoloração.

## **2.4.5 Análises histoquímicas de substâncias de reserva**

### **2.4.5.1 Fixação, pós-fixação e inclusão**

Embriões somáticos em diferentes fases de desenvolvimento (genótipo TRG3) e eixos embrionários retirados diretamente de bolotas maduras foram fixados em glutaraldeído a 25% preparado em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e pH 6,8 (Glauert e Lewis, 1998), contendo duas gotas de CaCl<sub>2</sub> 0,01 M, durante 3-4 horas. Após três lavagens de 15 minutos cada, no mesmo tampão à temperatura ambiente, procedeu-se à pós-fixação em tetróxido de ósmio 1%, preparado no mesmo tampão, durante 2 horas. O material foi deixado durante a noite no tampão, a 4 °C. Após nova lavagem de 15 minutos numa solução 50% diluída do tampão e de uma segunda lavagem em água, os espécimes foram tratados com acetato de uranilo (1%) durante 1 hora, no escuro, à



temperatura ambiente, seguida de duas lavagens em água. Procedeu-se em seguida à desidratação numa série crescente de etanol: 70, 80%, 90% e 95%, durante 15 minutos cada tratamento e 2x100% durante 20 minutos cada.

Para a impregnação e inclusão das amostras utilizou-se resina designada "Spurr" (Spurr, 1969). As amostras foram primeiramente impregnadas com quatro misturas de etanol e resina nas proporções 2:1, 1:1, 1:2 e 1:3 (2 h em cada mistura) e, por fim, com a resina pura durante uma noite. As amostras foram depois colocadas em moldes com a resina pura e a polimerização decorreu na estufa, a 60 °C, durante pelo menos 24 horas.

Dos blocos de material obtiveram-se cortes semi-finos (1-2 µm) num ultramicrotomo LKB ultratome III, usando facas de vidro. Os cortes foram recolhidos para uma gota de acetona 20%, em lâminas de vidro, secos a 60 °C e posteriormente corados com o corante de acordo com o tipo de composto de reserva a estudar.

#### **2.4.5.2 Aspeto geral das células**

Os cortes foram corados com uma solução de azul de toluidina 1% (solução aquosa de azul toluidina 1%, azur II 1% e borato de sódio 1%), durante cerca de 15 min, às escuras, à temperatura ambiente (O'Brien *et al.*, 1964). Após a coloração, procedeu-se a duas lavagens com água bidestilada, de forma a retirar o excesso de corante. De seguida os cortes foram secos numa estufa a 60 °C de um dia para o outro e as observações foram feitas num Microscópio Ótico de Campo Claro, Nikon Eclipse E400, equipado com uma máquina fotográfica digital Nikon Digital Sight DS-U1, usando o software Act-2U.

#### **2.4.5.3 Detecção de amido**

A deteção de polissacarídeos foi feita através da reação PAS (ácido periódico-reagente de Schiff; McManus, 1948), onde as secções foram oxidadas com uma solução aquosa de ácido periódico 1% durante 20 min, à temperatura ambiente, e, depois, lavados rapidamente numa solução de etanol a 70%. Esta foi seguida de uma lavagem em água bidestilada, durante aproximadamente 2 min. Os cortes foram, por fim, colocados no reagente de Schiff (fucsina descorada), no escuro, durante cerca de 3 h, seguindo-se uma lavagem em água corrente durante cerca de 5 min (adaptação de Feder

& O'Brien, 1968). Por fim, colocaram-se as lâminas na estufa a 60 °C a secar, de um dia para o outro e as observações foram feitas como descrito em 2.4.5.2.

#### **2.4.5.4 Detecção de lípidos**

Para a deteção de lípidos totais utilizou-se o lisocromo Negro de Sudão B (Pearse, 1972). As secções de material foram primeiramente mergulhadas em etanol 70% durante 1 minuto. De seguida procedeu-se à coloração numa solução saturada do corante (0,3%) em etanol a 70%, durante 2 horas, a 60 °C. Após rápida diferenciação em etanol a 70%, os cortes foram lavados em água bidestilada. As lâminas foram depois secas na estufa, à temperatura de 60 °C, de um dia para o outro e as observações foram feitas como descrito em 2.4.5.2.

#### **2.4.5.5 Detecção de proteínas**

Para a deteção de proteínas totais utilizou-se o corante azul mercúrio de bromofenol (Pearse, 1972). Os cortes foram tratados com água oxigenada (5 vol.) durante 30 minutos para desossificação do material. De seguida procedeu-se à coloração com uma solução de corante a 1% em etanol 95%, com cloreto de mercúrio 10%, durante 2h à temperatura ambiente. A diferenciação foi realizada numa solução aquosa de ácido acético 0,5% (3x15 min) e, depois de uma lavagem rápida em água bidestilada, uma lavagem em tampão fosfato de sódio, 0,1M, pH 7,0, durante 3 min e, por fim, uma nova lavagem em água bidestilada. No final as lâminas foram colocadas na estufa a 60 °C a secar de um dia para o outro e as observações foram feitas como descrito em 2.4.5.2.

## **2.5 Análise estatística**

Os resultados dos vários testes foram analisados no programa estatístico IBM SPSS Statistics 21. Foram efetuadas ANOVAs de uma via com os testes de Tukey associados para verificar se as diferenças entre as várias amostras eram, ou não, significativas ( $p < 0,05\%$ ). Para comparar as médias das concentrações de produtos de reserva, usaram-se apenas as amostras dos vários estádios de desenvolvimento de embriões somáticos do genótipo TRG3 e amostras de embriões zigóticos (eixos embrionários e frações cotiledonares).

### **3. Resultados**



## **3.1 Indução de embriogênese somática e manutenção de culturas embriogénicas**

### **3.1.1 Manutenção de culturas embriogénicas**

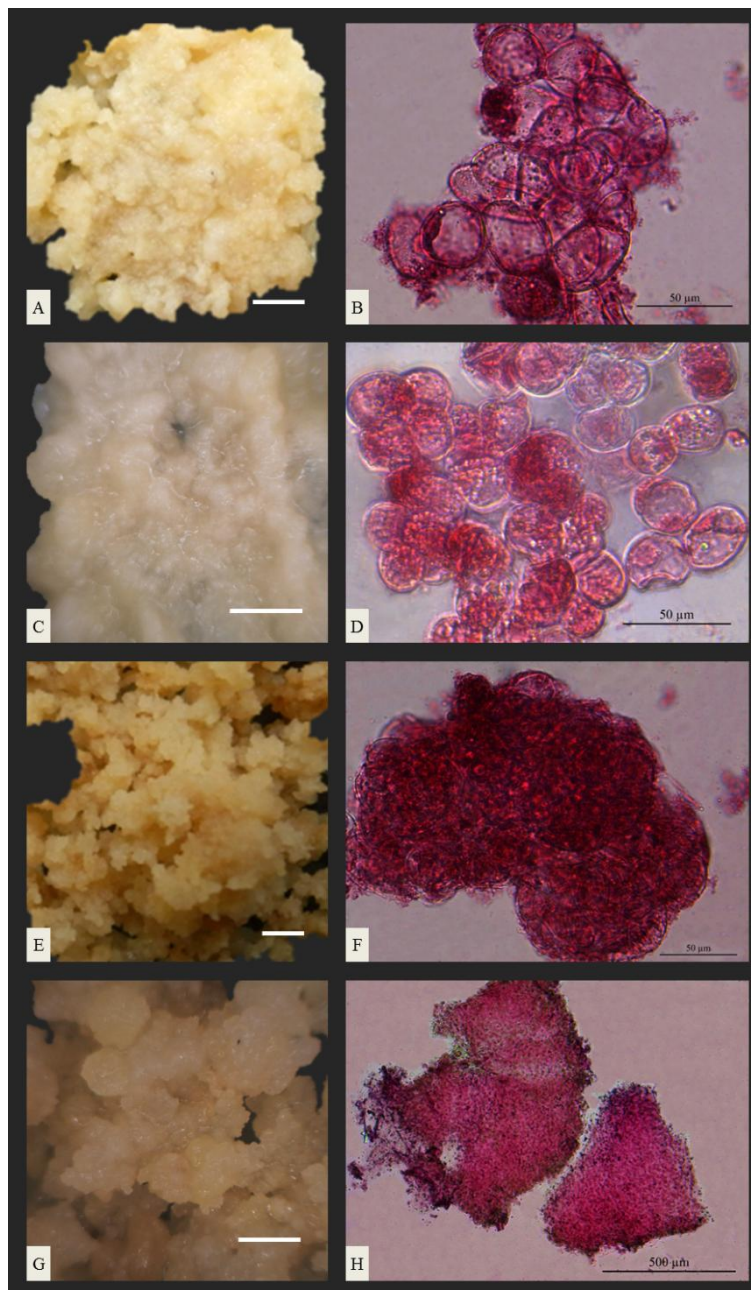
Os calos dos genótipos TRG3 e G80 colocados em proliferação em meio M4 sem reguladores de crescimento e no escuro apresentaram uma boa capacidade proliferativa. No entanto, o genótipo TRG3 apresentou um desenvolvimento mais rápido, tendo em consideração que, ao longo de 9 meses em cultura (subculturas a cada 6 semanas com 300-400 mg de calo), o número de tubos de cultura passou de 16 para 64, enquanto no genótipo G80 os 15 tubos iniciais apenas originaram 48 tubos de ensaio.

Durante esta fase de cultura os calos começaram a apresentar características distintas, tanto macroscópicas como microscópicas. Também, o seu comportamento, em termos de crescimento, foi diferente para cada genótipo. Assim, após cerca de 4 meses de cultura podiam distinguir-se calos não embriogénicos (Fig. 12A-D), mais friáveis e esbranquiçados, formados por células de maiores dimensões e muito vacuolizadas, que cresciam isoladas como se observa nas figuras 12B e 12D. Outros calos, designados embriogénicos (Fig. 12E-H), apresentavam-se mais compactos e com coloração amarela, e as suas células caracterizavam-se por terem um tamanho mais reduzido, serem isodiamétricas, com um citoplasma denso e pouco vacuolizado e uma elevada relação núcleo/citoplasma. Estas cresciam em aglomerados como se observa nas figuras 12F e 12H. No entanto, ao observar o calo embriogénico do genótipo G80 ao microscópio, verificou-se a presença de células com características não embriogénicas a proliferar nas proximidades de aglomerados embriogénicos (Fig. 13).

A separação dos dois tipos de calos (com e sem capacidade embriogénica), e a sua ulterior cultura no mesmo meio e condições, mostrou que os calos tinham um comportamento diferente, com os calos embriogénicos (Fig. 14E-H) a crescerem mais depressa que os calos não embriogénicos (Fig. 14A-D), a avaliar pela área de proliferação destes nos tubos de ensaio, durante um período de cultura de 20 dias.

Com a colocação de fragmentos dos diferentes calos embriogénicos e não embriogénicos de cada genótipo em meio M4 sem reguladores de crescimento, em condições de 16h luz:8h escuro, confirmou-se a identidade dos diferentes calos no

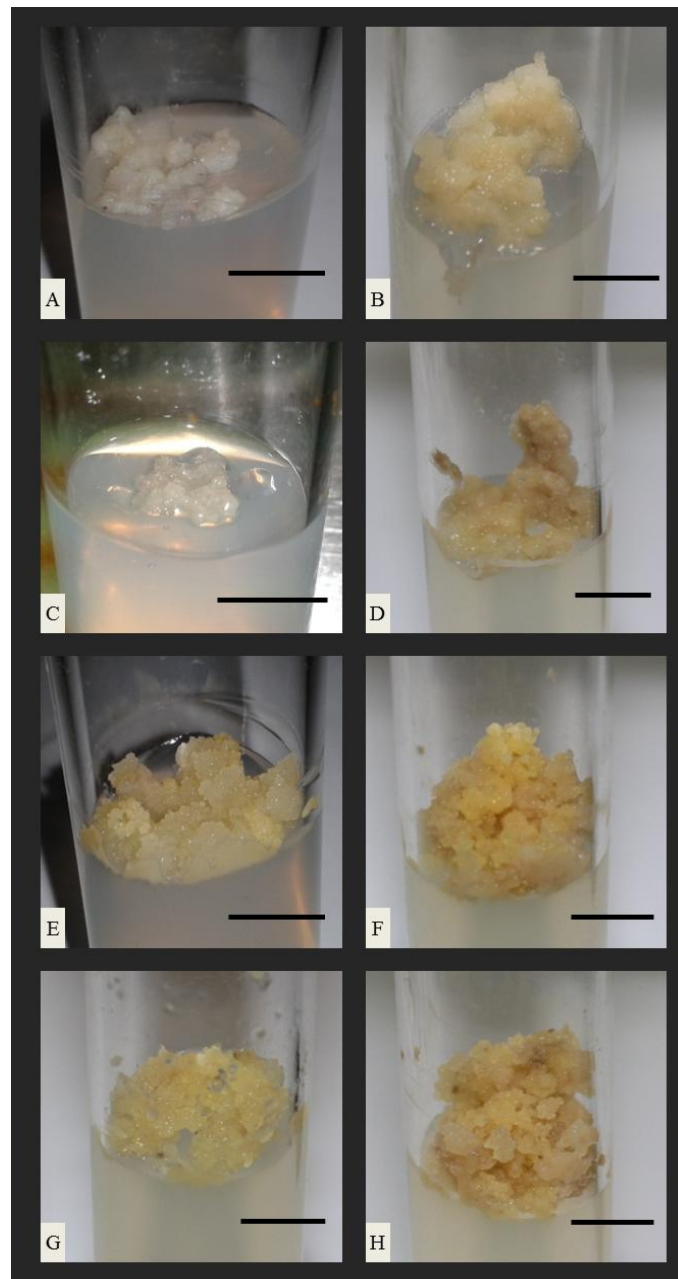
genótipo TRG3: os calos embriogênicos desenvolveram embriões somáticos e os calos não embriogênicos continuaram massas indiferenciadas sem capacidade de formar embriões (Fig. 15). No genótipo G80 a diferenciação macroscópica não foi muito perceptível, não se tendo obtido embriões somáticos nos calos embriogênicos (Fig. 15C), e apenas umas zonas mais compactas que outras.



**Figura 12** Observação macro e microscópica (após coloração com orceína acética) do aspeto dos diferentes calos. Calo não embriogénico de G80 (A-B); Calo não embriogénico de TRG3 (C-D); Calo embriogénico de G80 (E-F); Calo embriogénico de TRG3 (G-H). As barras correspondem a 1 cm (A, C, E, G), 50  $\mu$ m (B, D, F) e 500  $\mu$ m (H).

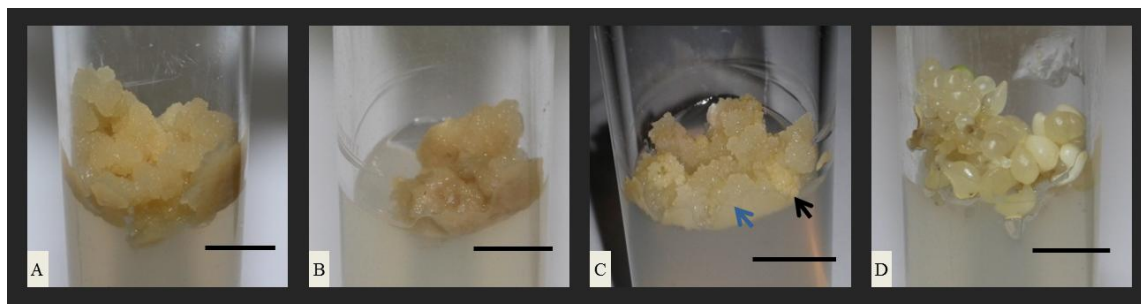


**Figura 13.** Aspeto de calo embriogénico de G80, observado ao microscópio após coloração com orceína acética, onde se observam células de aspeto não embriogénico (seta azul) próximas de células embriogénicas (seta laranja). A barra corresponde a 50  $\mu$ m.



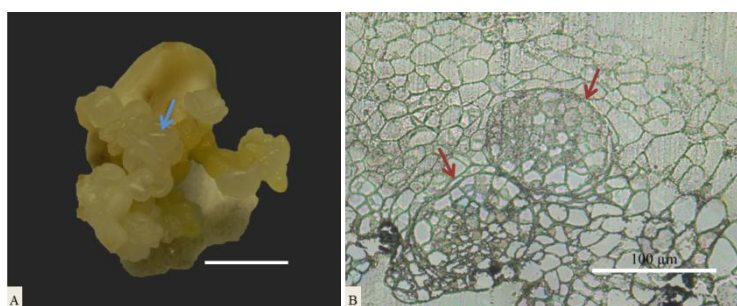
**Figura 14** Comparação do crescimento dos calos não embriogénicos (A-D) e dos calos embriogénicos (E-H) durante 20 dias. Calo não embriogénico de G80 (A-B); Calo não embriogénico de TRG3 (C-D); Calo embriogénico de G80 (E-F); Calo embriogénico de TRG3 (G-H). As barras correspondem a 1 cm.





**Figura 15** Verificação da incapacidade embriogénica dos calos não embriogénicos de G80 e TRG3 (A e B respetivamente) e da capacidade embriogénica do calo embriogénico de TRG3 (D) pela formação de embriões somáticos. Os calos embriogénicos de G80 (C) não formaram embriões somáticos, tendo-se apenas observado a presença de zonas mais compactas (seta preta) e zonas mais friáveis (seta azul). As barras correspondem a 1 cm.

Em cultura, os embriões do genótipo TRG3 proliferaram (Fig. 15D), dando origem a um grande número de embriões em diferentes estádios de desenvolvimento, ocorrendo também fenómenos de embriogénese recorrente espontânea, pela subcultura no mesmo meio M4 e sob as mesmas condições de cultura. Os embriões recorrentes surgiam a partir do eixo embrionário ou dos cotilédones de embriões somáticos previamente formados, como se observa na figura 16.



**Figura 16.** Ocorrência de embriogénese recorrente em embriões somáticos do genótipo TRG3. **A.** embriões somáticos (seta) originados a partir de outros previamente formados; **B.** secção de um embrião somático onde se podem observar dois novos embriões somáticos em fases precoces de desenvolvimento (setas). As barras correspondem a 1 cm (A) e 100 µm (B).

### 3.1.2 Indução *de novo* de embriogénese somática em segmentos foliares

Após a colocação das estacas em cultura na estufa, os primeiros sinais de abrolhamento surgiram após 16 dias, tendo o abrolhamento sido particularmente eficaz no genótipo SA (Fig. 17). Os diferentes genótipos formaram folhas com morfologia distinta, tendo-se verificado que as folhas do genótipo SA se apresentavam maiores e mais vigorosas (Fig. 18). Para este genótipo foram usadas 90 folhas na indução de

embriogénese somática, e para os genótipos SR e SH foram usadas 30 folhas. No caso dos genótipos SH2 e SF, com abrolhamento induzido numa altura diferente do ano (novembro), não se conseguiu obter folhas em quantidade suficiente para a realização dos ensaios, mesmo após cerca de 2 meses em estufa, altura em que o ensaio terminou.



**Figura 17.** Abrolhamento no genótipo SA após diferentes períodos de cultura. **A.** 18 dias; **B.** 20 dias; **C.** 25 dias e **D.** 30 dias. As barras correspondem a 1 cm.



**Figura 18.** Exemplos de folhas de cada genótipo obtidas por abrolhamento e recolhidas para indução de *callus*. A barra corresponde a 1 cm.

O ensaio de indução de embriogénese somática neste material mostrou que as folhas do genótipo SA não produziram qualquer tipo de calo após a cultura no meio M2 com uma grande concentração de reguladores de crescimento (Fig. 19A), tendo degenerado após algum tempo em cultura. No caso dos genótipos SR e SH, obtiveram-se calos, e as percentagens de indução foram, respetivamente de 100% e 96%, após 2 meses de cultura. Os calos obtidos (Fig. 19B) surgiram à superfície das folhas, e apresentavam um aspeto amarelado e pouco friável.

Após esta primeira fase, os calos obtidos dos genótipos SH e SR foram fragmentados e subcultivados em meio M3, com uma concentração menor de reguladores de crescimento, sendo estes NAA e BAP. No caso do genótipo SH, todos os calos oxidaram após a transferência para este novo meio. Do genótipo SR, os calos



induzidos com 2,4-D e KIN oxidaram, enquanto os outros mantiveram o seu aspeto inicial.

Os calos do genótipo SR foram ulteriormente transferidos intactos para o meio M4, onde se observou o aparecimento de embriões somáticos (Fig. 19C). Das diferentes combinações hormonais testadas no meio M2, aquela onde o número de embriões (formados a partir do total de folhas cultivadas por tratamento) foi mais elevado foi a combinação de 50  $\mu\text{M}$  NAA e 10  $\mu\text{M}$  BAP, em que se formaram cerca de 11 embriões (tabela 3).

**Tabela 3.** Formação de embriões somáticos no genótipo SR, após cultura em meio M4 de calos obtidos em meio M3, e na presença de diferentes combinações de auxina e citocinina em meio M2. Resultados registados após 3 meses de cultura.

Meio	Número embriões formados
A. 50 $\mu\text{M}$ NAA + 10 $\mu\text{M}$ BAP	10,7 $\pm$ 4,7 <sup>a</sup>
B. 50 $\mu\text{M}$ NAA + 9 $\mu\text{M}$ KIN	6,0 $\pm$ 2,6 <sup>ab</sup>
C. 4,5 $\mu\text{M}$ 2,4D + 9 $\mu\text{M}$ KIN	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>b</sup>
D. 4,5 $\mu\text{M}$ 2,4D + 10 $\mu\text{M}$ BAP	6,3 $\pm$ 4,0 <sup>ab</sup>

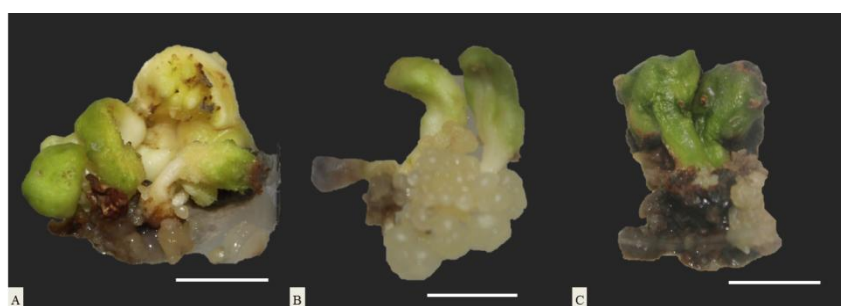
Os valores apresentados são a média  $\pm$  desvio padrão de tratamentos com um número total de 8 explantes em três réplicas cada um. As diferentes letras que acompanham cada coluna indicam diferenças significativas entre as amostras (teste de Tukey,  $p < 0.05$ ).

A subcultura dos embriões de SR fez-se em meio M2, com a combinação de hormonas que obteve mais sucesso na indução de embriões somáticos na fase primária de indução (A), de forma a induzir mais embriões somáticos por embriogénese recorrente (Fig. 19D). Nesta altura todo o calo obtido no genótipo SR desenvolveu embriões ou oxidou completamente. Os embriões (somáticos e secundários) foram transferidos para meio sem hormonas (M4) de forma a promover o seu crescimento e proliferação e mais fenómenos de embriogénese recorrente, que foram ocorrendo espontaneamente.

A contínua subcultura dos embriões somáticos no meio M4, sem reguladores de crescimento, levou também à aquisição de uma cor verde nos cotilédones dos embriões, não apresentando estas capacidade de germinação (Fig. 20).



**Figura 19.** Indução de embriogênese somática em folhas de *Q. suber*. **A.** aspecto das folhas após 7 dias de cultura em meio M1; **B.** aspecto dos calos após transferência das folhas para meio M2; **C.** embriões somáticos em diferentes fases de desenvolvimento em meio M3; **D.** embriões secundários (seta azul) obtidos por embriogênese recorrente a partir de embriões somáticos previamente formados (seta vermelha). As barras correspondem a 1 cm.

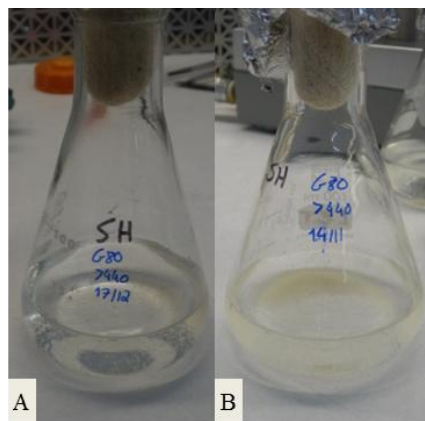


**Figura 20.** Embriões somáticos do genótipo SR com a cor verde que não conseguiram germinar. As barras correspondem a 1 cm.

## 3.2 Desenvolvimento de embriões somáticos em *calli* previamente induzidos

### 3.2.1 Proliferação de calos em meio líquido

Calos dos genótipos TRG3 e G80 transferidos para meio líquido cresceram consideravelmente após 8 meses de cultura (Fig. 21), sendo que entre cada subcultura de 5 semanas, os 250-450 mg de calo iniciais proliferaram até cerca de 1000-1200 mg (agregados entre 400 e 1000  $\mu\text{m}$ ), 800-850 mg (agregados inferiores a 400  $\mu\text{m}$ ) e 900-1100 mg (agregados superiores a 1000  $\mu\text{m}$ ). Estes calos apresentaram características mistas de calos embriogênicos e calos não embriogênicos, não se tendo formado nenhum embrião somático. No entanto, os agregados de tamanhos inferiores a 400  $\mu\text{m}$  apresentaram-se mais friáveis e esbranquiçados do que agregados das outras frações. Os agregados de tamanho superior a 1000  $\mu\text{m}$  apresentaram-se mais compactos e amarelados (apresentando algumas zonas acastanhadas).

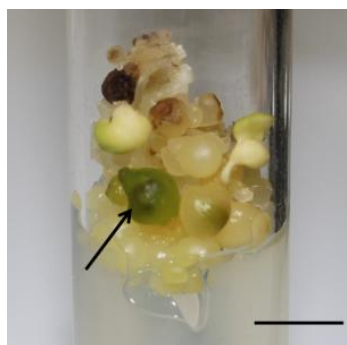


**Figura 21.** Culturas de calo em meio líquido. **A.** Erlenmeyer contendo cerca de 250 mg de calo no início das culturas (tempo 0). **B.** Células em suspensão após um mês de cultura, com cerca de 1000 mg.

Com a passagem dos calos do meio líquido para o meio sólido observou-se que a transferência direta das células (sem a filtração das células a vácuo) fez com que o volume do calo se tenha mantido sem crescimento durante 2 meses. Já quando a filtração das células envolveu o recurso a vácuo, os calos proliferaram para cerca do dobro do volume no mesmo intervalo de tempo e adquiriram características macroscópicas embriogênicas (maioritariamente).

### **3.2.2 Maturação e conversão dos embriões somáticos**

Após a colocação isolada de embriões somáticos e secundários obtidos na secção 3.1.1 em condições de frio (4 °C) durante 60 dias para a promoção da germinação do genótipo TRG3, nenhuma plântula foi obtida. Com a promoção da maturação dos embriões somáticos do genótipo TRG3 através da adição de ABA ao meio de cultura, o maior desenvolvimento que se observou foi a obtenção de uma cor verde nos cotilédones dos embriões somáticos (Fig. 22), sem que tivessem sido obtidas plântulas.



**Figura 22.** Embriões somáticos do genótipo TRG3 que não germinaram, evidenciando a cor verde nos cotilédones (seta). A barra corresponde a 1 cm.

### 3.3 Análise histoquímica e bioquímica dos compostos de reserva

#### 3.3.1 Quantificação de produtos de reserva e separação SDS-PAGE de proteínas

A análise dos compostos de reserva nos diferentes tipos de material mostrou diferenças muito nítidas (Tabela 4), em particular quando se compararam os cotilédones dos embriões zigóticos com os embriões somáticos.

**Tabela 4.** Teor de açúcares solúveis, amido, lípidos e proteínas totais (mg/g peso fresco) das várias amostras de CE, CNE, embriões somáticos e zigóticos estudadas.

	<b>Açúcares Solúveis (mg/g)</b>	<b>Amido (mg/g)</b>	<b>Lípidos totais (mg/g)</b>	<b>Proteínas totais (mg/g)</b>
<b>G80 CNE</b>	<b>8,32 ± 0,5</b>	<b>7,40 ± 0,6</b>	-	<b>5,75*</b>
<b>G80 CE</b>	<b>6,78 ± 0,3</b>	<b>6,64 ± 0,8</b>	-	<b>3,35*</b>
<b>TRG3 CNE</b>	<b>3,82 ± 0,5</b>	<b>2,91 ± 0,7</b>	-	<b>0,09*</b>
<b>TRG3 CE</b>	<b>3,56 ± 0,3</b>	<b>2,84 ± 0,5</b>	<b>231,60 ± 57,9</b>	<b>1,80 ± 1,2</b>
<b>TRG3 ES1</b>	<b>1,65 ± 0,1<sup>d</sup></b>	<b>2,48 ± 0,4<sup>d</sup></b>	<b>52,40 ± 4,2<sup>b</sup></b>	<b>2,79 ± 0,3<sup>c</sup></b>
<b>TRG3 ES2</b>	<b>3,46 ± 0,1<sup>c</sup></b>	<b>3,15 ± 0,3<sup>d</sup></b>	<b>33,99 ± 2,6<sup>c</sup></b>	<b>1,78 ± 0,1<sup>d</sup></b>
<b>TRG3 ES3</b>	<b>4,51 ± 0,2<sup>b</sup></b>	<b>4,23 ± 0,7<sup>c</sup></b>	<b>38,28 ± 2,0<sup>c</sup></b>	<b>2,67 ± 0,2<sup>cd</sup></b>
<b>TRG3 ES4</b>	<b>7,27 ± 0,4<sup>a</sup></b>	<b>8,67 ± 0,3<sup>b</sup></b>	<b>32,74 ± 1,6<sup>c</sup></b>	<b>4,70 ± 0,4<sup>b</sup></b>
<b>SR ES4</b>	<b>3,65 ± 0,1</b>	<b>4,82 ± 0,3</b>	-	-
<b>EE</b>	<b>17,29 ± 0,4</b>	<b>33,02 ± 1,2</b>	-	<b>18,55 ± 0,5<sup>a</sup></b>
<b>Cotilédones</b>	<b>7,68 ± 0,1<sup>a</sup></b>	<b>13,89 ± 0,1<sup>a</sup></b>	<b>82,83 ± 9,9<sup>a</sup></b>	-

G80 CNE, G80 CE, TRG3 CNE e TRG3 CE = Calos Não Embriogénicos e Calos Embriogénicos de G80 e TRG3; TRG3 ES1, ES2, ES3 e ES4 = estádios 1-4 de embriões somáticos de TRG3; SR ES4 = embriões maduros de SR; EE = eixos embrionários; cotilédones = fragmentos cotiledonares de embriões zigóticos.

Os valores apresentados são a média ± desvio padrão de tratamentos com três réplicas cada um. As amostras com (\*) foram quantificadas apenas com uma réplica e as amostras com um (-) não foram quantificadas. Em cada coluna letras diferentes indicam diferenças significativas entre as amostras (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Segundo os resultados, apenas o amido é o composto de reserva com uma tendência de acumulação crescente durante o desenvolvimento dos embriões somáticos (com diferenças estatísticas significativas entre os estádios), apesar dos seus valores em embriões somáticos ser menor que em embriões zigóticos (comparam-se valores máximos de 9 mg/g em embriões somáticos do genótipo TRG3 com um valor de cerca

de 14 mg/g em cotilédones de embriões zigóticos). A fração de eixos embrionários também foi estudada, obtendo-se 33 mg/g de amido. Tendo em conta que este valor foi obtido pela junção de 5 eixos embrionários de 5 bolotas, num total de 100 mg, pode assumir-se que o valor total de amido será de cerca de 0,66 mg em cada eixo embrionário. Já no caso do valor de amido em cotilédones, apenas uma bolota foi suficiente para completar o peso total amostrado. Repare-se ainda que o teor de amido num embrião somático maduro do genótipo TRG3 (9 mg/g) é superior ao encontrado num embrião no mesmo estágio do genótipo SR (5 mg/g). Repare-se também nos teores de cerca de 3mg/g no genótipo TRG3 em amostras de *calli* com teores de 7 mg/g de amido no genótipo G80 para o mesmo tipo de amostras.

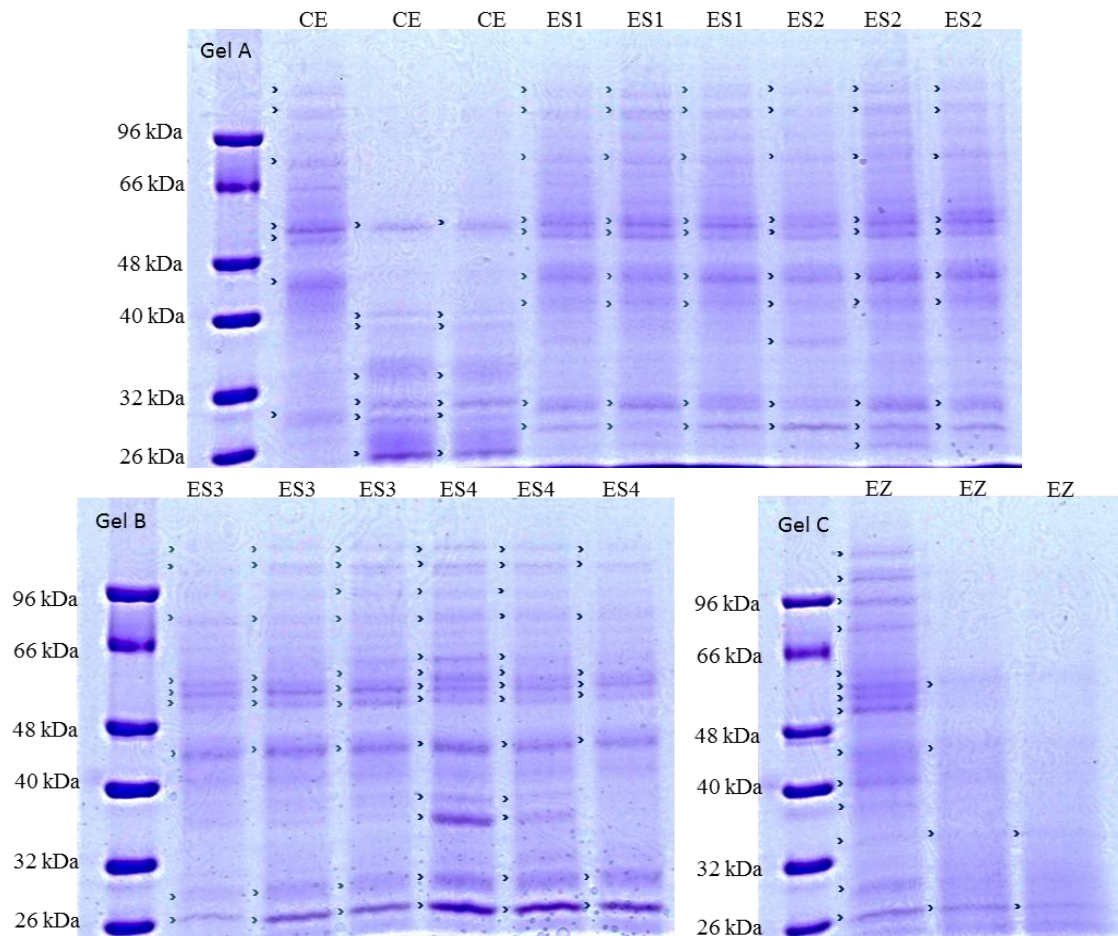
O teor de açúcares solúveis, apesar de não ser produto de reserva, foi estimado para avaliar a atividade metabólica nas células através da diferença entre açúcar a ser usado e açúcar de reserva. Neste caso, verificou-se que o teor de açúcares solúveis vai aumentando ao longo do desenvolvimento dos estádios embrionários (com diferenças estatísticas significativas), mas, neste caso, os embriões somáticos maduros atingem os mesmos valores de açúcares solúveis de embriões zigóticos (cerca de 7,5 mg/g). Mais uma vez, a influência do genótipo é significativa uma vez que no genótipo SR os embriões somáticos maduros apresentaram um teor de açúcar solúvel próximo do valor encontrado em embriões somáticos do estágio 2 no genótipo TRG3. Também nas amostras de *calli* o genótipo influencia nos valores obtidos: cerca de 4 mg/g de açúcares solúveis em calos de TRG3 e 7 mg/g de açúcares solúveis em calos de G80.

No estudo do teor lipídico chegou-se a valores máximos de 53 mg/g em embriões somáticos, comparando com valores de 83 mg/g de lípidos totais em embriões zigóticos. Dos três tipos de produtos de reserva analisados, é no teor lipídico que os dois tipos de embriões (somáticos e zigóticos) mais se assemelham. Ao longo do desenvolvimento dos embriões somáticos a acumulação de lípidos mantém-se num valor próximo de 35 mg/g (sem diferenças estatísticas significativas), e apenas o primeiro estágio tem maior teor lipídico que os outros estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos considerados (52 mg/g). O calo embriogénico apresenta um teor lipídico cerca de 3 vezes superior ao teor lipídico dos embriões zigóticos.

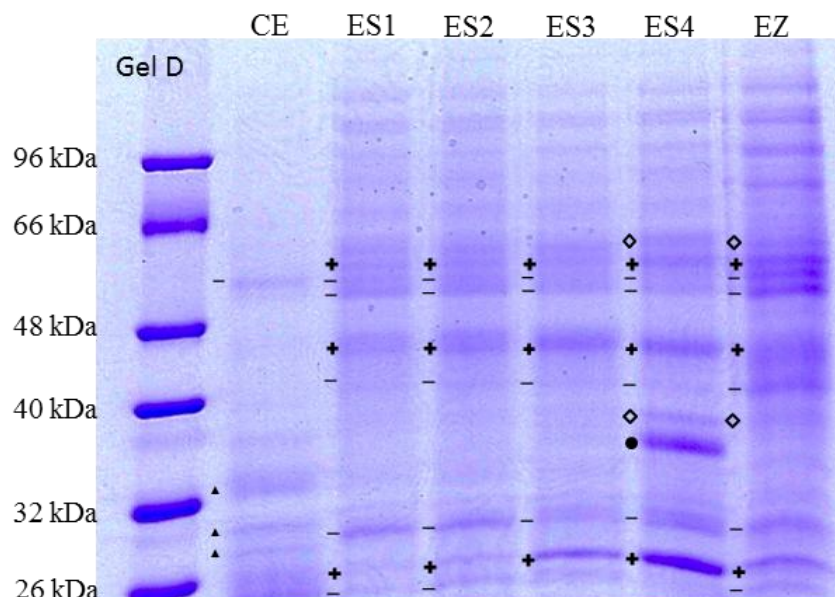
Em relação ao teor proteico os vários estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos foram apenas comparados com eixos embrionários e não com os cotilédones de embriões zigóticos. Mesmo assim é significativa a diferença na quantidade de proteínas totais encontrada num tipo e noutro de embriões: os embriões zigóticos

apresentam cerca de 19 mg/g de proteína, enquanto os embriões somáticos (em qualquer dos estádios considerados) nunca atingem os 5 mg/g. Em relação aos vários estádios de desenvolvimento, observa-se que o teor proteico vai aumentando a partir do segundo estádio de desenvolvimento (com diferenças estatísticas significativas), e que o primeiro estádio apresenta uma quantidade de proteínas totais superior ao terceiro estádio. Apesar do calo não embriogénico do genótipo TRG3 e dos calos do genótipo G80 terem sido quantificados apenas numa réplica em relação à quantidade de proteína que possuíam, observa-se que não existe uma tendência para um tipo de calo ter mais proteína que outro e que a influência do genótipo é muito grande (enquanto no genótipo TRG3 o teor proteico não ultrapassa os 2 mg/g de proteína, no genótipo G80 o menor valor encontrado foi de 3,35 mg/g de proteína).

O resultado da separação dos perfis proteicos das amostras por SDS-PAGE permitiu comparar os vários estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos, as amostras de calo embriogénico e as amostras de embriões zigóticos. Em relação aos géis de comparação das várias réplicas de cada amostra (Fig. 23) obtiveram-se os géis A, B e C. Em relação às amostras de calo embriogénico o padrão obtido por uma das amostras foi diferente das outras duas; nas amostras de embriões somáticos do primeiro, segundo, terceiro e quarto estádios os perfis proteicos foram muito semelhantes entre réplicas; nas amostras de embriões zigóticos o perfil de uma das réplicas foi muito diferente das outras duas, apresentando mais bandas. Da comparação dos perfis proteicos ao longo do desenvolvimento embrionário com a comparação com os embriões zigóticos obteve-se o gel D (Fig. 24). A comparação dos diferentes perfis permite observar a presença de várias bandas cuja intensidade varia com o evoluir dos estádios, e a sua correspondência ou não com os embriões zigóticos. Bandas de proteínas com cerca de 60 kDa, 46 kDa e outra de 26 kDa vão aumentando de expressão ao longo dos vários estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos e bandas que vão diminuindo a sua expressão, com cerca de 50 kDa, 40 kDa e 30 kDa. Além disso, observam-se ainda bandas específicas do calo. O perfil proteico dos embriões somáticos no estádio 4 (ES4) apresenta muitas semelhanças ao perfil proteico dos embriões zigóticos, com exceção da presença de uma banda de elevada intensidade, com cerca de 35-38 kDa, que surge unicamente neste estádio de desenvolvimento dos embriões somáticos.



**Figura 23.** Comparação dos perfis proteicos das três réplicas de cada amostra de calo embriogénico (CE), dos quatro estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos (ES1, ES2, ES3 e ET4) e de eixos embrionários (EZ).



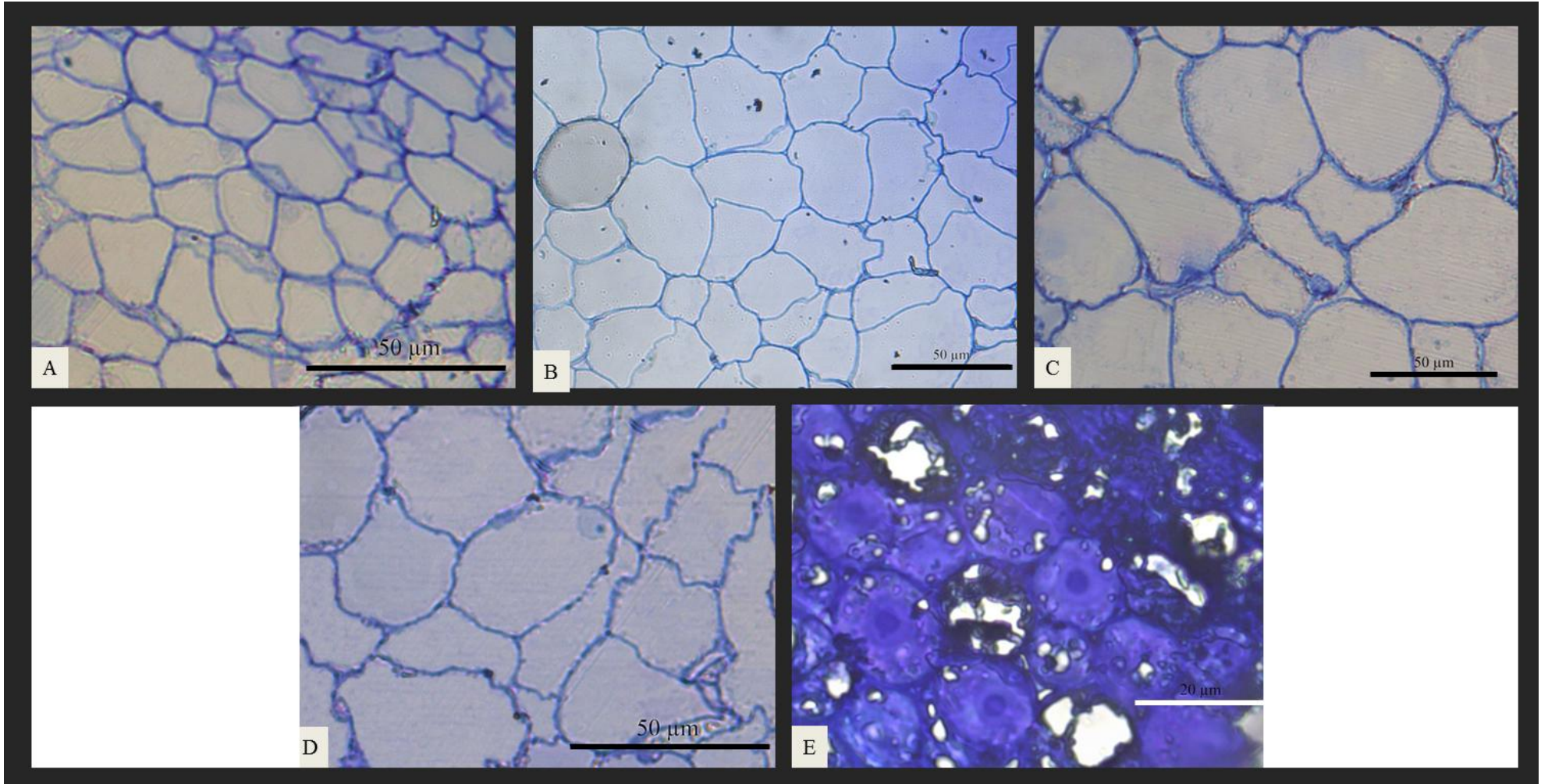
**Figura 24.** Comparação dos perfis proteicos das amostras de calo embriogénico (CE), dos quatro estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos (ES1, ES2, ES3 e ES4) e de eixos embrionários (EZ). ((+) aumento da expressão com a maturação dos embriões somáticos; (-) diminuição da expressão; (▲) banda apenas presente no estádio de calo; (●) banda apenas presente no estádio 4 de embriões somáticos; (◇) comum a embriões somáticos maduros e embriões zigóticos).

### **3.3.2 Análises histoquímicas de substâncias de reserva**

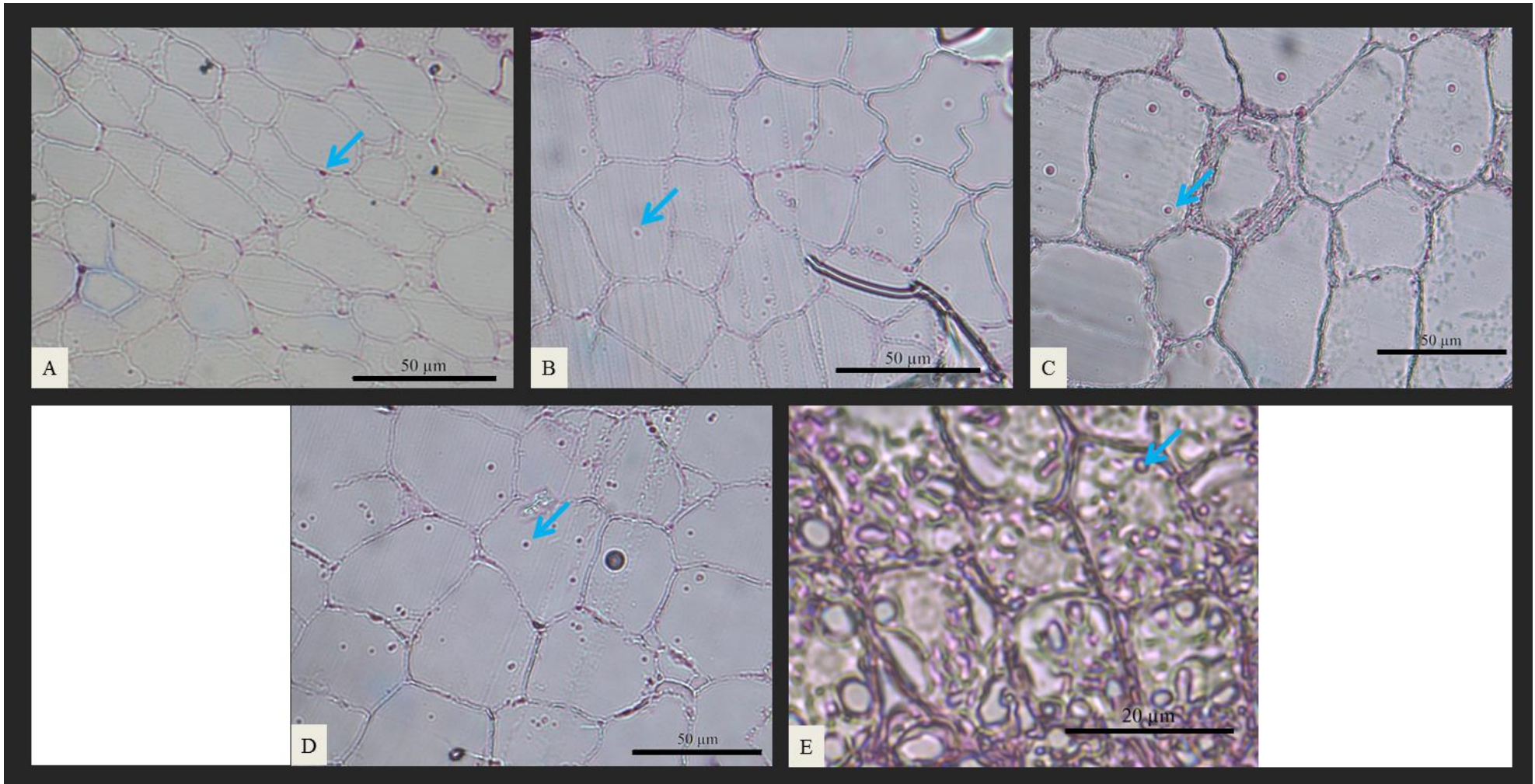
As análises com toluidina mostraram que os tecidos dos embriões somáticos se apresentam bastante vacuolizados (Fig. 25A-D) enquanto as células dos embriões zigóticos apresentam um citoplasma bastante denso, com nucléolo proeminente e uma elevada relação núcleo citoplasma (Fig. 25E). Para além disso, verifica-se que as células dos embriões somáticos são de maiores dimensões (até 50  $\mu\text{m}$ ) que as dos zigóticos (cerca de 20  $\mu\text{m}$ ).

Nas figuras 26, 27 e 28 observam-se as células somáticas e zigóticas coradas com a técnica PAS, negro sudão B e azul de bromofenol, para observação de grãos de amido, corpos lipídicos e proteicos, respetivamente. Os resultados obtidos com este estudo histológico vêm confirmar os valores registados com o estudo bioquímico, observando-se um maior número de grãos de amido em células de estádios mais maduros de embriões somáticos, verificando a discrepância no número de grãos de amido que existe entre células do estágio 4 com células do eixo embrionário; um nível constante de corpos lipídicos nas células somáticas durante o desenvolvimento embrionário, e uma maior quantidade destes nas células zigóticas; e, também, observando um aumento no número de corpos proteicos ao longo do desenvolvimento embrionário somático, notando que estes estão em maior quantidade nas células zigóticas.



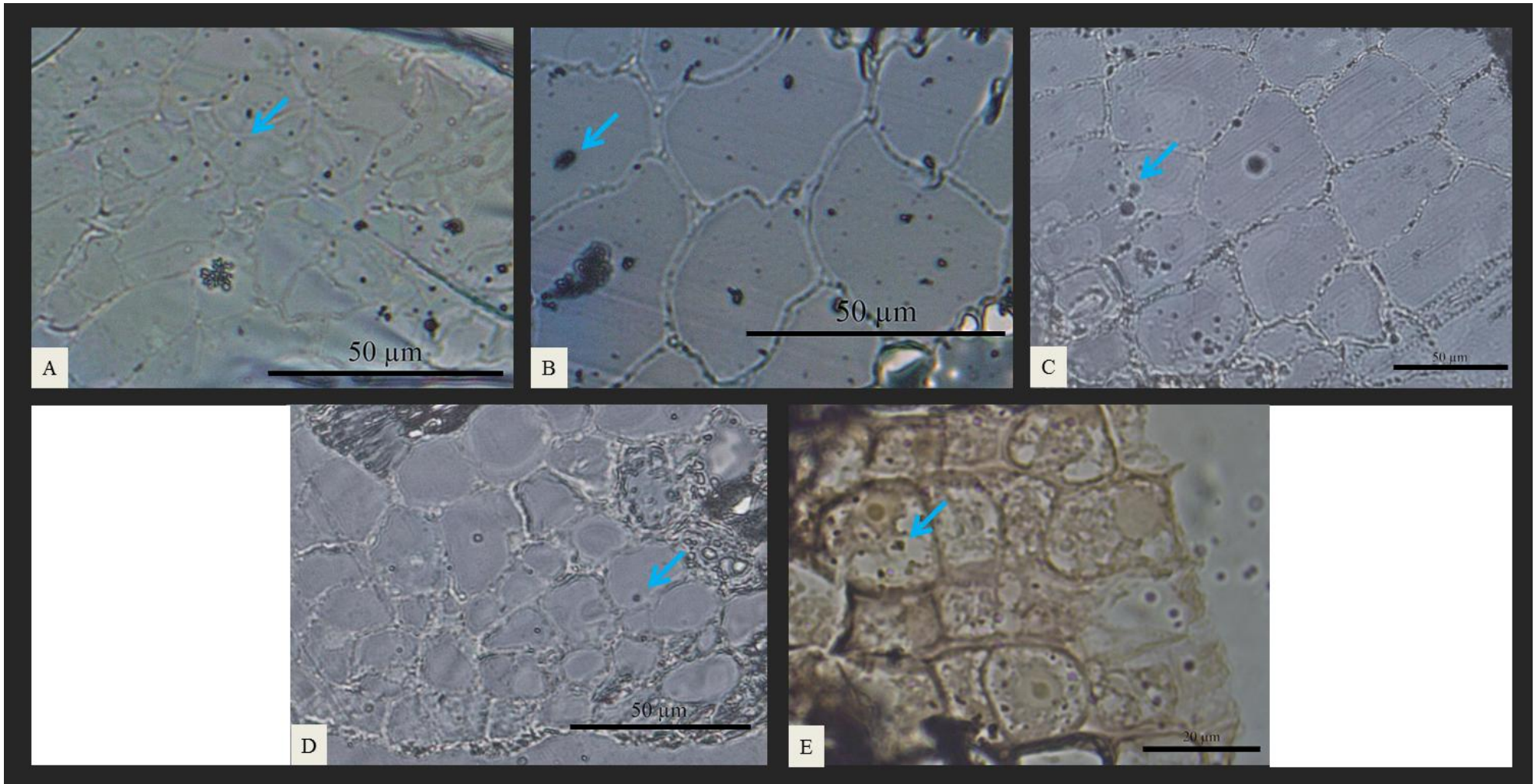


**Figura 25.** Observação de tecidos de embriões somáticos e zigóticos corados com azul de toluidina para observação do aspeto celular, pela coloração das paredes. **A.** embrião somático do primeiro estágio; **B.** embrião somático do segundo estágio; **C.** embrião somático do terceiro estágio; **D.** embrião somático do quarto estágio; **E.** embrião zigótico. As barras correspondem a 50 μm (A-D) e 20 μm (E).

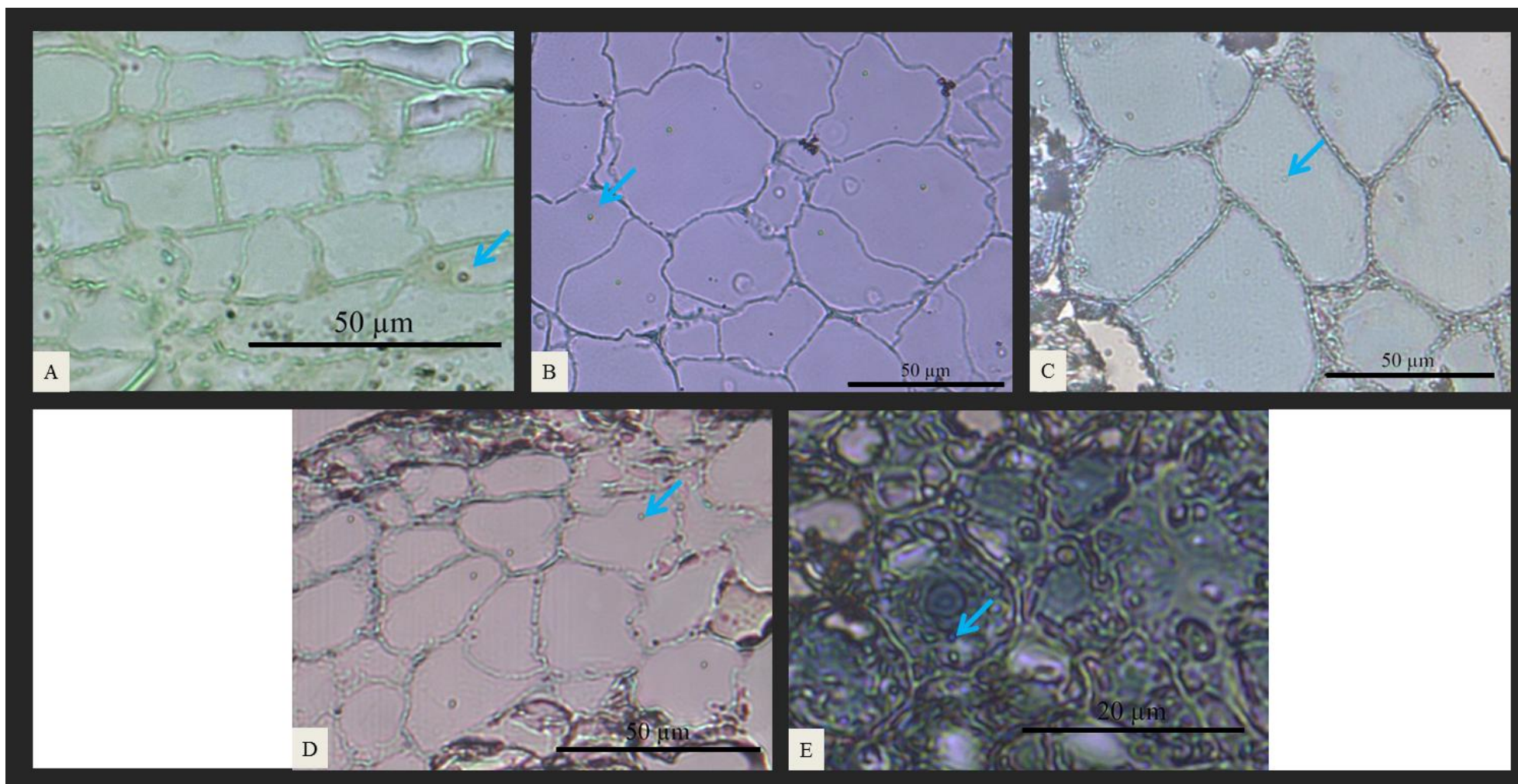


**Figura 26.** Observação de tecidos de embriões somáticos e zigóticos corados com ácido periódico/reagente de Schiff para observação da distribuição de grãos de amido (setas). **A.** embrião somático do primeiro estágio; **B.** embrião somático do segundo estágio; **C.** embrião somático do terceiro estágio; **D.** embrião somático do quarto estágio; **E.** embrião zigótico. As barras correspondem a 50 μm (A-D) e 20 μm (E).





**Figura 27.** Observação de tecidos de embriões somáticos e zigóticos corados com negro sudão B para observação da distribuição de corpos lipídicos (setas). **A.** embrião somático do primeiro estágio; **B.** embrião somático do segundo estágio; **C.** embrião somático do terceiro estágio; **D.** embrião somático do quarto estágio; **E.** embrião zigótico. As barras correspondem a 50  $\mu\text{m}$  (A-D) e 20  $\mu\text{m}$  (E).



**Figura 28.** Observação de tecidos de embriões somáticos e zigóticos corados com azul de Bromofenol para observação da distribuição de corpos proteicos (setas). **A.** embrião somático do primeiro estágio; **B.** embrião somático do segundo estágio; **C.** embrião somático do terceiro estágio; **D.** embrião somático do quarto estágio; **E.** embrião zigótico. As barras correspondem a 50 μm (A-D) e 20 μm (E).

## 4. Discussão





## 4.1 Indução de embriogénese somática e manutenção de culturas embriogénicas

Os ensaios realizados neste trabalho tiveram como base o protocolo de indução de embriogénese somática em *Q. suber* desenvolvido por Hernández *et al.* (2003a) a partir de folhas de árvores adultas. Existem vários trabalhos que descrevem a indução de embriogénese somática em condições diferentes (Fernández-Guijarro *et al.*, 1995; Hernández *et al.*, 1999; Toribio *et al.*, 1999; Pinto *et al.*, 2002). A opção pela metodologia dos autores acima referidos deveu-se à circunstância do material já estabelecido *in vitro*, com o qual se fizeram alguns ensaios, ter sido obtido segundo aquele protocolo.

Em traços gerais, os resultados confirmaram os dados previamente obtidos em génotipos de origem espanhola, tendo sido induzida a formação de embriões somáticos a partir de folhas jovens resultantes do abrolhamento de estacas. Verificou-se ainda que o período do ano em que se estimulou o abrolhamento e a ulterior indução de embriogénese somática em folhas condicionou fortemente o sucesso da indução, à semelhança do observado por outros autores (Rohde *et al.*, 1997). De facto, embora as condições de abrolhamento tenham sido semelhantes nos diferentes períodos, a fisiologia das árvores é fortemente condicionada pelas condições ambientais, o que se reflete no estado nutricional da planta e nos níveis de hormonas vegetais e de outros reguladores de crescimento (Taiz e Zeiger, 2006), condicionando assim a resposta dos explantes *in vitro*.

Para a indução de embriogénese somática usaram-se quatro combinações de auxinas e citocininas, tendo-se verificado que o meio com 50µM de NAA e 10µM de BAP deu melhores resultados. Para além da composição em reguladores de crescimento, o génotipo também foi um fator que condicionou a indução sendo o génotipo SR aquele em que as taxas de indução foram mais elevadas. A embriogénese somática é um tipo de morfogénese que, à semelhança do que acontece noutros processos de desenvolvimento *in vitro*, é muito dependente do génotipo (Parrot *et al.*, 1988). Este aspeto poderá estar relacionado com a própria morfologia e organização anatómica das folhas, que mostrou ser diferente nos diferentes génotipos utilizados, embora uma componente mais relacionada com combinações genéticas mais favoráveis à indução tenha também que ser equacionada. Como já foi referido, o génotipo dos

explantos é um dos mais importantes fatores que condiciona a embriogénese somática (Anderson *et al.*, 2001) e, no sobreiro, esse aspeto já foi comprovado (Toribio *et al.*, 1999; Hernández *et al.*, 2003b).

Um dos aspetos estudados neste trabalho foi a possibilidade de obter calos embriogénicos e não embriogénicos a partir de um mesmo genótipo. A obtenção de calos com estas características é muito importante do ponto de vista da compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à indução e desenvolvimento dos embriões somáticos, pois permite a comparação entre os perfis de macromoléculas nos dois tipos de calos (Marsoni *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009; Correia *et al.*, 2012a). A utilização de técnicas de genómica ou proteómica pode depois identificar proteínas ou genes que controlam a indução. Ensaio deste tipo foram realizados no nosso laboratório, no tamarilho e permitiram a identificação de uma proteína com um possível papel inibidor da embriogénese (Correia, 2011). No caso do sobreiro, partiu-se de dois genótipos já estabelecidos *in vitro* (TRG3 e G80) e com potencial de sofrer embriogénese recorrente (Jiménez, *et al.*, 2013). Os resultados indicam que a partir dos embriões somáticos iniciais foi possível obter calos com a capacidade de formar embriões e calos onde essa capacidade não existe ou está bloqueada. Os dois tipos de calos apresentavam características morfológicas e citológicas diferentes, nomeadamente em termos de coloração, consistência e organização celular, com os calos embriogénicos a caracterizarem-se por serem mais compactos, de coloração amarelada e com as células organizadas em massas proembriogénicas. Um aspeto interessante é que a distinção entre os dois tipos de calos é muito mais nítida em meio sólido do que em meio líquido. Segundo Sun *et al.* (2010) a agitação dos meios induz stresse hidrodinâmico na cultura, o que afeta negativamente processos de diferenciação de culturas embriogénicas de *Picea*. Por outro lado, tendo em conta que nos meios líquidos o contacto dos tecidos com o meio é mais acentuado e que a agitação pode remover compostos secretados para o exterior das células, isto pode significar que os componentes do meio e/ou compostos produzidos pelas células (como proteínas arabinogalactanas, AGPs) terão um papel importante no controlo da morfogénese (van Hengel *et al.*, 2001). Estes calos podem ser mantidos em meios sólidos sem reguladores de crescimento (meio M4) e, como já foi referido, serão futuramente utilizados em análises de proteómica e genómica com o objetivo de melhor compreender a embriogénese somática nesta espécie.

A proliferação em meio líquido sem reguladores de crescimento mostrou ser dependente do tamanho dos agregados celulares, à semelhança do observado por outros

autores (Jiménez *et al.*, 2011). Esta é das poucas espécies onde uma cultura nestas condições é possível (Burns e Wetzstein, 1997) e, neste caso, verificou-se que os agregados de tamanho superior a 400 µm e inferior a 1000 µm apresentaram uma melhor proliferação. No caso de trabalhos de Jiménez *et al.* (2011), com a mesma espécie, foi a fração de 41-800 µm que originou um maior número de estruturas embriogénicas. Agregados com tamanho inferior a este eram constituídos por restos celulares e agregados celulares sem organização; agregados maiores mostraram sinais de necrose e de libertação de compostos fenólicos e de oxidação da cultura, levando a números reduzidos de estruturas potencialmente embriogénicas.

Para além dos ensaios de proliferação e de obtenção de calos não embriogénicos e embriogénicos, foi também analisado o desenvolvimento de embriões somáticos a partir dos calos embriogénicos. Os resultados mostraram que os embriões surgem em diferentes estados de desenvolvimento, ou seja de forma assíncrona, à semelhança do observado por El Maâtaoui *et al.* (1990) e Toribio (2005) nesta mesma espécie. No entanto, esta situação é comum a muitas espécies (Wilhelm, 2000). Após a cultura em meio para indução de embriogénese recorrente, não se notou o decréscimo da capacidade de multiplicação dos embriões, o mesmo tendo sido verificado nos trabalhos originais em que este protocolo foi testado (Hernández *et al.*, 2003a). Na sua maioria, os embriões secundários formados a partir dos embriões somáticos surgiram indiretamente, a partir de um calo formado na zona do eixo embrionário ou, mais raramente, dos cotilédones dos embriões primários. Resultados análogos foram obtidos nesta espécie nos trabalhos de Puigderrajols *et al.* (1996). De acordo com Pinto *et al.* (2009) a embriogénese recorrente ou secundária é muito eficiente como método de clonagem pois permite uma produção contínua de plantas a partir de embriões previamente estabelecidos.

Nenhum dos embriões somáticos obtidos durante a cultura conseguiu germinar, mesmo após exposição a um meio com ácido abscísico (ABA) para promover a sua maturação (Stasolla e Yeung, 2003) e com um tratamento por frio para poderem germinar mais facilmente. Hernández *et al.* (2003b) justificaram esta dificuldade com a influência do genótipo do explante e com falta de compostos de reserva nos embriões somáticos. Segundo Gaj (2004), o ABA promove a acumulação de substâncias de reserva. O passo da conversão dos embriões em plântulas é o passo mais complexo do processo de embriogénese somática, pois a taxa de sucesso é geralmente baixa (Pinto *et al.*, 2002). Nestes resultados, e como observado por Chalupa (1995) na mesma espécie,



o desenvolvimento dos embriões somáticos foi bloqueado depois da formação dos cotilédones, os quais chegaram a adquirir uma tonalidade verde, mas, não prosseguiram o seu desenvolvimento. Os ensaios de Hernández *et al.* (2003b) mostraram uma taxa de conversão de 40% dos embriões somáticos tendo os autores justificado os dados com uma deficiente acumulação de reservas nos cotilédones. Deste modo, protocolos alternativos têm que ser desenvolvidos para aumentar a eficiência da clonagem do sobreiro por embriogénese somática. Segundo Pinto *et al.* (2009), as alternativas para a maturação dos embriões somáticos passam por dessecação parcial sob condições de elevada humidade e de tratamentos de “starvation”. García-Martín *et al.* (2001) sugerem a incubação dos embriões somáticos maduros durante 2 meses em condições de escuro e frio (4 °C) seguida de cultura na presença de luz.

## **4.2 Análise histoquímica e bioquímica dos compostos de reserva**

Como foi referido na secção anterior, um processo eficaz de regeneração de plantas por embriogénese somática pressupõe que os embriões somáticos obtidos possam germinar de forma eficaz e ser convertidos em plantas (Canhoto, 2010), não apresentando anomalias morfológicas ou fisiológicas e sofrendo um processo de desenvolvimento e maturação tão semelhante quanto possível aos respetivos embriões zigóticos.

Desta forma, procurou-se estudar a acumulação de produtos de reserva durante o desenvolvimento dos embriões somáticos de sobreiro para comparação com os embriões zigóticos, de forma a tentar justificar a incapacidade na obtenção de plântulas a partir dos muitos embriões somáticos induzidos.

As análises histológicas mostraram que as células dos embriões somáticos de sobreiro se apresentam bastante vacuolizadas, são de grandes dimensões e possuem um conteúdo citoplasmático reduzido, tal como observado por Puigderrajols *et al.* (2000). Estas características contrastam marcadamente com as células dos embriões zigóticos, de dimensões mais reduzidas, com um citoplasma denso, rico em organitos de reserva e pouco vacuolizadas. Observações semelhantes foram feitas no tamarilho (Correia *et al.*, 2012b) e noutras espécies (Correia e Canhoto, 2010; Pinto *et al.*, 2010). Para além disso, os embriões somáticos apresentam um maior grau de hidratação, situação a que

não serão alheias as condições de cultura com elevada humidade relativa. Em condições naturais, o desenvolvimento do embrião zigótico no interior da semente, é acompanhado por uma desidratação acentuada do próprio embrião e dos tecidos envolventes, sendo essa desidratação considerada um passo crucial para a ulterior capacidade germinativa (Stasolla & Yeung, 2003). A reduzida acumulação de materiais de reserva nas células dos embriões somáticos, confirmada por quantificação bioquímica de lípidos, amido, açúcares solúveis e proteínas, pode ser um dos fatores responsáveis pela baixa taxa de conversão dos embriões somáticos. No entanto, outros fatores como anomalias na organização dos meristemas apicais do caule e da raiz e/ou a acumulação de compostos inibidores nos embriões, podem também contribuir para este resultado (Merkle, 1995).

O único produto de reserva que se verificou sofrer um aumento durante a embriogénese somática foi o amido. No entanto, esta situação pode ser devida à composição dos meios de cultura, ricos em sacarose, que poderão promover a acumulação de grãos de amido nas células (Horbowicz *et al.*, 1995). Segundo Martin *et al.* (2000) a embriogénese somática é um processo morfogenético que requer uma quantidade elevada de energia e, por conseguinte, o catabolismo do amido pode resultar em compostos intermediários de glicose que forneçam o ATP necessário para o metabolismo da célula (Cangahuala-Inocente *et al.*, 2009).

A acumulação de lípidos tendeu a manter-se constante durante o desenvolvimento embrionário somático, apresentando os níveis mais elevados no estado de calo embriogénico (com um teor lipídico cerca de três vezes superior aos embriões zigóticos). Esta situação pode explicar-se pelo facto de no estado de calo embriogénico as células apresentarem ainda uma reduzida vacuolização, ao contrário do que se verifica nos estados mais avançados do desenvolvimento embrionário, como foi anteriormente referido. Esta situação significa que as células, durante o processo de diferenciação, consomem grande parte das reservas, que parece ser contrário ao desenvolvimento embrionário zigótico, em que a acumulação de reservas ocorre à medida que o embrião vai desenvolvendo. Também Puigderrajols *et al.* (2001) constataram que os níveis de lípidos totais atingem um valor superior numa fase de calo embriogénico, mesmo antes da iniciação da formação dos embriões somáticos. Noutras espécies onde se estudou a acumulação lipídica durante o desenvolvimento de embriões somáticos, como o estudo de Grigová *et al.* (2007) em *Picea abies*, concluiu-se que a concentração de lípidos totais varia ao longo do desenvolvimento, apresentando o pico de valores durante a fase cotiledonar. Tal como nos outros produtos de reserva, a

acumulação lipídica das células somáticas nunca atinge o valor da acumulação de lípidos das células de origem zigótica. Segundo Thomas e Jiménez (2005) esta acumulação de lípidos parece estar relacionada com um controlo hormonal exercido pelo ácido abscísico. Teria sido interessante estudar uma mais correta maturação dos embriões somáticos em meios de cultura com ABA e outros agentes que têm sido descritos na literatura como promotores da maturação (Dodeman *et al.*, 1997; von Arnold *et al.*, 2002; Rose *et al.*, 2010), com o intuito de verificar se pelo menos os valores de lípidos totais acumulados em embriões somáticos maduros se aproximariam dos valores de lípidos totais encontrados em células de embriões zigóticos.

Em relação à quantidade de proteínas, durante o desenvolvimento embrionário observa-se que existe tendência para um aumento a partir do estágio 2 de desenvolvimento. Do primeiro estágio para o segundo verificou-se uma diminuição do teor de proteína. Esta diminuição poderia ser atribuída ao consumo destas pela ativação do metabolismo celular que ocorreu especialmente nos tecidos do explante onde células simples ou grupo de células são determinantes para o estabelecimento e expressão da competência embriogénica (Cangahuala-Inocente, 2007).

Comparando embriões somáticos no estágio 4 (ES4) com embriões zigóticos, observou-se que os embriões somáticos apresentam menor teor proteico que os embriões zigóticos. No entanto, esta comparação foi feita entre embriões somáticos inteiros com eixos embrionários, portanto tecidos diferentes. Como as reservas dos embriões zigóticos se encontram principalmente em células dos cotilédones, teria sido interessante comparar o teor proteico entre frações cotiledonares de embriões somáticos com frações cotiledonares de embriões zigóticos, para verificar se a diferença obtida com este teste se mantinha alta ou se era atenuada. Em *Eucalyptus nitens*, ao comparar células cotiledonares de embriões somáticos com o mesmo tipo de células de embriões zigóticos, verificou-se que a diferença no teor de proteínas de reserva entre os dois era muito pequena (Bandyopadhyay e Hamill, 2000). Já outros trabalhos feitos em *Pisum sativum* (Griga *et al.*, 2007) e *Phoenix dactylifera* (Sané *et al.*, 2006) também encontraram concentrações proteicas menores em embriões somáticos do que em células de embriões zigóticos. Em tamarilho, a quantificação bioquímica de proteínas totais mostrou um nível semelhante entre embriões somáticos e zigóticos, enquanto a análise histoquímica mostrou que esta acumulação era menor nas células dos embriões somáticos (Correia *et al.*, 2012b).

A quantificação das reservas armazenadas e a análise dos perfis proteicos por SDS-PAGE revelou diferenças significativas entre as várias réplicas biológicas para as amostras que se designaram de “calo embriogénico”. Esses extratos são na verdade resultantes de uma mistura de células onde a maioria tem a capacidade embriogénica mas também onde existem muitas células sem essa capacidade, o que justifica as variações observadas. Tal constatação já tinha sido referenciada na análise de proteómica de calos embriogénicos e não embriogénicos de tamarilho (Correia *et al.*, 2012a), que apesar de serem isolados durante as subculturas, apresentam sempre uma uniformidade das células recolhidas, sobretudo no material embriogénico. De forma a otimizar o processo, seria interessante encontrar uma forma de separar as células embriogénicas e não embriogénicas para culturas em separado.

Relativamente ao perfil proteico das restantes amostras, correspondentes aos diversos estádios de desenvolvimento, observa-se maior uniformidade dos perfis obtidos, o que traduz uma maior consistência na diversidade de proteínas expressas nos embriões somáticos para casa estágio considerado. Não obstante esta observação, é também notória a diferença de intensidade de algumas bandas entre réplicas, sobretudo para os embriões no estágio 4, indicando que provavelmente os embriões somáticos usados para obter os extratos proteicos pertenceriam ao mesmo estágio, mas um estaria mais maduro que os outros dois (para o estágio 4 apenas um embrião foi necessário para perfazer os 100 mg de uma das réplicas, enquanto as outras duas réplicas necessitaram de 3 e 4 embriões somáticos para completar esse mesmo peso fresco). Estas observações também se verificaram para as amostras obtidas de eixos embrionários.

Comparando os perfis proteicos de todas as amostras é evidente a variação, ao longo dos diversos estádios de desenvolvimento, da intensidade de algumas bandas específicas, de peso molecular inferior a cerca de 60 kDa, cuja expressão se vai acentuando em detrimento de outras cuja expressão vai diminuindo. Estes resultados refletem as alterações bioquímicas ao nível da regulação celular nos diversos estádios de desenvolvimento. No entanto, e apesar desta variação quantitativa, é possível observar que qualitativamente os perfis proteicos apresentam-se bastante semelhantes, o que de alguma forma indica que, do ponto de vista fisiológico, os embriões somáticos nos estádios iniciais da maturação já expressam as proteínas que constam do perfil de um embrião somático após maturação. Tal constatação é consistente com as observações para outras espécies, como em *Pisum sativa* (Griga *et al.*, 2007), relativamente às proteínas de reserva acumuladas ao longo do desenvolvimento dos embriões somáticos.

Os dois tipos de embriões (somáticos e zigóticos) no estado maduro apresentam os seus perfis proteicos bastante semelhantes, com algumas diferenças quantitativas relativas à intensidade de algumas bandas e à expressão de uma banda com cerca de 35-40 kDa, que surge apenas no perfil dos embriões somáticos. Estas diferenças poderão estar relacionadas com a ocorrência de modificações pós-traducionais, ou serem induzidas pelas condições de stress inerentes à cultura *in vitro* (Griga *et al.*, 2007), podendo a sua identificação ajudar a explicar o insucesso dos embriões somáticos em germinar. Nesse sentido, será importante avançar com a identificação e caracterização das proteínas detetadas nestas bandas, de forma a otimizar o processo de maturação dos embriões somáticos de sobreiro, e a conseguir igualar ao máximo o seu desenvolvimento ao dos embriões zigóticos, para que a obtenção de plântulas seja mais fácil.

## 5. Conclusão



Os resultados obtidos mostraram que o protocolo de indução de embriogénese somática utilizado pode também ser aplicado à indução de embriogénese somática em diversos genótipos de sobreiro. Este aspeto é muito importante, pois muitas vezes, e em função do grande número de fatores que podem afetar a indução de embriogénese somática, torna-se difícil reproduzir protocolos desenvolvidos noutros laboratórios.

Os dados também mostraram ser possível a obtenção de material embriogénico e não embriogénico o que permitirá realizar ensaios futuros de comparação dos perfis de macromoléculas entre os dois tipos. Este tipo de estudos, á semelhança do que foi feito noutras espécies, poderá permitir a identificação de fatores que especificamente controlem o processo embriogénico.

Com os resultados obtidos foi possível concluir que se verifica uma deficiente acumulação de compostos de reserva nos embriões somáticos de sobreiro em relação aos embriões zigóticos, que certamente ajuda a explicar, pelo menos em parte, as reduzidas taxas de obtenção de plantas nesta espécie quando comparadas com o número de embriões que é possível obter. Deste modo, torna-se necessário otimizar as condições de maturação dos embriões somáticos de forma a tornar o processo mais rentável, estudando diferentes composições de meios de cultura onde os embriões se desenvolvem. A identificação dos produtos de reserva que se vão acumulando ao longo do desenvolvimento embrionários também é importante uma vez que não é só a quantidade de proteína ou lípidos (por exemplo) que existe nas células, mas sim a sua identificação para poder estudar as suas interações e reações no crescimento das células e maturação dos embriões.

Os estudos de análise proteica permitiram identificar algumas diferenças na expressão de proteínas durante o desenvolvimento embrionário. Ensaios futuros permitirão caracterizar estas proteínas e determinar o seu envolvimento na embriogénese.

## 6. Referências bibliográficas

- Alves, A.A.M. (1988). Técnicas de produção florestal (2ª ed.). Instituto Nacional de Investigação Científica. Lisboa.
- Anderson, J.V., Chao, W.S. & Horvath, D.P. (2001). A current review on the regulation of dormancy in vegetative buds. *Weed Science*, 49, 581-589.
- Bandyopadhyay, S. & Hamill, J.D. (2000). Ultrastructural studies of somatic embryos of *Eucalyptus nitens* and comparisons with zygotic embryos found in mature seeds. *Annals of Botany*, 86, 237-244.
- Bartos, P. (2012). Embriogénese somática do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e caracterização bioquímica e anatômica das diferentes etapas envolvidas no processo. Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biológicas - Universidade de Brasília, Brasil.
- Bellarosa, R. (2003). Introduction: Brief Synthesis of the Current Knowledge on Cork Oak. In Varela, M.C. (Ed.) Handbook of the concerted action: European network for the evaluation of genetic resources of cork oak for appropriate use in breeding and gene conservation strategies. Estação Florestal Nacional. Lisboa.
- Bewley, J.D. & Black, M. (1994). Seeds: physiology of development and germination (2ª ed.). Plenum Press. New York.
- Bradford, M.M. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brownfield, D.L., Todd, C.D., Stone, S.L., Deyholos, M.K. & Gifford, D.J. (2007). Patterns of storage protein and triacylglycerol accumulation during loblolly pine somatic embryo maturation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 88, 217-223.
- Bueno, M., Astorga, R., Manzanera, J. (1992). Plant regeneration through somatic embryogenesis in *Quercus suber*. *Physiologia Plantarum*, 85, 30-34.
- Bueno, M., Gómez, A., Boscaiu, M., Manzanera, J., Vicente, O. (1997). Stress induced haploid plant production from anther cultures of *Quercus suber*. *Physiologia Plantarum*, 99, 335-341.



- Burns, J.A. & Wetzstein, H.Y. (1997). Development and characterization of embryogenic suspension cultures of pecan. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 48, 93-102.
- Cangahuala-Inocente, G. (2007). Caracterização morfofisiológica, bioquímica e proteômica da embriogênese zigótica e somática da goiabeira serrana (*Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret). Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Centro de Ciências Agrárias – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.
- Cangahuala-Inocente, G., Steiner, N., Maldonado, S. & Guerra, M. (2009). Patterns of protein and carbohydrate accumulation during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44, 217-224.
- Canhoto, J.M. (2010). *Biologia Vegetal. Da clonagem de Plantas à Transformação Genética*. Imprensa da Universidade de Coimbra. Coimbra.
- Carrier, D.J., Kendall, E.J., Bock, C.A., Cunningham, J.E. & Dunstan, D.I. (1999). Water content, lipid deposition, and abscisic acid content in developing white spruce seeds. *Journal of Experimental Botany*, 50, 1359-1364.
- Chalupa (1995) Somatic embryogenesis in oak (*Quercus* spp.) In Jain S, Gupta P & Newton R (Eds.) *Somatic embryogenesis in Woody Plants 2* (67-87). Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- Chawla, H.S. (2002). *Introduction to Plant Biotechnology* (2<sup>a</sup> ed.). Science Publishers, Inc. New Hampshire.
- Chawla, H.S. (2009). *Introduction to Plant Biotechnology* (3<sup>a</sup> ed.). Science Publishers, Inc. New Hampshire.
- Correia, A.V. & Oliveira, A.C. (1999). Principais espécies florestais com interesse para Portugal. Zonas de influência mediterrânica. *Estudos e Informação* nº318. Direcção-Geral das Florestas.
- Correia, A.E.C. (2010). Análise de substâncias de reserva em embriões zigóticos e somáticos de feijoa e de tamarilho - otimização da embriogênese somática. Dissertação de Mestrado, Departamento Ciências da Vida – Universidade de Coimbra, Portugal.
- Correia, S.I.M. (2011). Somatic embryogenesis in *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt (tamarillo): optimization and molecular analysis. Tese de Doutoramento, Departamento Ciências da Vida – Universidade de Coimbra, Portugal.

- Correia, S. & Canhoto, J.M. (2010). Characterization of somatic embryo attached structures in *Feijoa sellowiana* Berg. (Myrtaceae). *Protoplasma*, 242, 95–107.
- Correia, S., Vinhas, R., Manadas, B., Lourenço, A.S., Veríssimo, P. & Canhoto, J. (2012a). Comparative Proteomic Analysis of Auxin-Induced Embryogenic and Nonembryogenic Tissues of the Solanaceous Tree *Cyphomandra betacea* (Tamarillo). *Journal of Proteome Research*, 11, 1666-1675.
- Correia, S., Cunha, A.E., Salgueiro, L., Canhoto, J.M. (2012b) Somatic embryogenesis in tamarillo (*Cyphomandra betacea*): approaches to increase efficiency of embryo formation and plant development. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture*, 109, 143-152.
- Dodeman, V.L., Ducreux, G., Kreis, M. (1997). Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany*, 48, 1493–1509.
- Elena-Rosselló, J.A. & Cabrera, E. (1996). Isozyme Variation in Natural Populations of Cork-Oak (*Quercus suber* L.). Population structure, Diversity, Differentiation and Gene Flow. *Silvae Genetica*, 45, 229-235.
- El Maâtaoui, M. & Espagnac, H. (1987). Néof ormation de structures de type embryons somatiques sur des cultures de tissues de chêne liège (*Quercus suber* L). *Comptes rendus de l'Académie des sciences*, 304, 83-88.
- El Maâtaoui, M., Espagnac, H. & Michaux-Ferrière, N. (1990). Histology of callogenesis and somatic embryogenesis induced in stem fragments of cork oak (*Quercus suber*) cultured in vitro. *Annals of Botany*, 6, 183-190.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations – <http://www.fao.org/biotech/>.
- Feder, N. & O'Brien, T.P. (1968). Plant microtechnique: some principles and new methods. *American Journal of Botany*, 55, 123-142.
- Feirer, R.P., Conkey, J.H. & Verhagen, S.A. (1989). Triglycerides in embryogenic conifer calli: a comparison with zygotic embryos. *Plant Cell Reports*, 8, 207-209.
- Féraud-Keller, C., El Maâtaoui, M., Gouin, O. & Espagnac, H. (1989). Embryogenèse somatique chez trois espèces de chenes méditerranéens. *Annales des Sciences Forestières*, 46, 130-132.
- Fernandes, J.P.V. (2012). Micropropagation in elite cork oak tress: a tool for suber production improvement? Tese de Doutoramento, Departamento de Biologia – Universidade de Aveiro, Portugal.

- Fernández-Guijarro, B., Celestino, C., Toribio, M. (1995). Influence of external factors on secondary embryogenesis and germination in somatic embryos from leaves of *Quercus suber*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 41, 99-106.
- Filho, J.M. (2005). *Fisiologia de Sementes de Plantas Cultivadas 12*. Fealq. Piracicaba.
- Folch, J., Lees, M. & Sloane, S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.
- 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.
- García-Martín, G., González-Benedito, M.E. & Manzanera, J.A. (2001). *Quercus suber* L. somatic embryo germination and plant conversion: pretreatments and germination conditions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 37, 190-198.
- García-Martín, G., Manzanera, J.A & González-Benedito, M.E. (2005). Effect of exogenous ABA on embryo maturation and quantification of endogenous levels of ABA and IAA in *Quercus suber* somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 80, 171–177.
- Gamborg, O.L. (1966). Aromatic metabolism in plants. II. Enzymes of the shikimate pathway in suspension cultures of plant cells. *Canadian Journal of Biochemistry*, 44, 791–799.
- Gil, L. & Varela M.C. (2008). EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for cork oak (*Quercus suber*). Bioversity International, Rome, Italy. Acedido fevereiro, 28, 2013 de <http://www.inia.pt/>.
- Glauert, A.M. & Lewis, P.R. (1998). *Biological Specimen Preparation for Transmission Electron Microscopy 17*. Portland Press. London.
- Gómez, A., López, J., Pintos, B., Camafeita, E. & Bueno, M. (2009). Proteomic analysis from haploid and diploid embryos of *Quercus suber* L. identifies qualitative and quantitative differential expression patterns. *Proteomics*, 9, 4355–4367.
- Griga, M., Horáček, J. & Klenotická, H. (2007). Protein patterns associated with *Pisum sativum* somatic embryogenesis. *Biologia Plantarum*, 51, 201-211.
- Grigová, M., Kubes, M., Drázná, N., Rezanka, T. & Lipavska, H. (2007). Storage lipid dynamics in somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*): histochemical and quantitative analyses. *Tree Physiology*, 27,1533–1540.

- Haberlandt, G. (1902). Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Math. Naturwiss. Kl. Kais. Akad. Wiss. Wien., 111, 69-92.
- Hansen, J. & Moller, I. (1975). Percolation of starch and soluble carbohydrates from plant tissue for quantitative determination with anthrone. Analytical Biochemistry, 68, 87-94.
- Hernández, I., Celestino, C., Martínez, J., Hornero, J., Gallego, J. & Toribio, M. (1999) Induction of somatic embryogenesis in leaves from mature *Quercus suber* trees. In: O’Riordain, F. (Ed.) Physiology and control of plant propagation in vitro. Eur Cost Action 822 (17–18). Office for Official Publications of the European Communities. Krakow.
- Hernández, I., Celestino, C. & Toribio, M. (2003a). Vegetative propagation of *Quercus suber* L. by somatic embryogenesis. I. Factors affecting the induction in leaves from mature cork oak trees. Plant Cell Reports, 21, 759-764.
- Hernández, I., Celestino, C., Alegre, J. & Toribio, M. (2003b). Vegetative propagation of *Quercus suber* L. by somatic embryogenesis. II. Plant regeneration from selected cork oak trees. Plant Cell Reports, 21, 765-770.
- Heywood, V.H., Brummitt, R.K., Culham, A. & Seberg, O. (2007). Flowering Plant Families of the World. Firefly Books Ltd. Ontario.
- Hodge, J.E. & Hofreiter, B.T. (1962). In: Whistler, R.L. & Be Miller, J.N (eds.) Methods in Carbohydrate Chemistry. Academic Press. New York.
- Horbowicz, M., Obendorf, R.L., McKersie, B.D. & Viands, D.R. (1995). Soluble saccharides and cyclitols in alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos, leaflets, and mature seeds. Plant Science, 109, 191-198.
- ICNF, 2013. IFN6 – Áreas dos usos do solo e das espécies florestais de Portugal continental. Resultados preliminares. Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas. Lisboa.
- INE (2009). Instituto Nacional de Estatística. Acedido em dezembro de 2012.
- Infopedia (s.d.) Sobreiro (*Quercus suber*) e sua distribuição em Portugal. Acedido março 28, 2013, de [http://www.infopedia.pt/\\$sobreiro;jsessionid=ABovFbrryaivc5vWseWv4w\\_\\_](http://www.infopedia.pt/$sobreiro;jsessionid=ABovFbrryaivc5vWseWv4w__)
- Isewaki, H. (2010). Relação entre acúmulo de lipídios e germinação. Curso de Agronomia, Faculdade de Engenharias e Ciências Agrárias do Centro Universitário de Patos de Minas, Patos de Minas.

- Jiménez, J., Alonso-Blázquez, N., López-Vela, D., Celestino, C., Toribio, M. & Alegre, J. (2011). Influence of culture vessel characteristics and agitation rate on gaseous exchange, hydrodynamic stress, and growth of embryogenic cork oak (*Quercus suber* L.) cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 47, 578-588.
- Jiménez, J., López-Vela, D., Ruiz-Galea, M., Celestino, C., Toribio, M. & Alegre, J. (2013). Embryogenic suspensions of adult cork oak: the first step towards mass propagation. *Trees*, 27, 13-23.
- Levine, M. (1947) Differentiation of Carrot Root Tissue Growing In Vitro. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 74, 321-328.
- Manzanera, J., Astorga, R. & Bueno, M. (1993). Somatic embryo induction and germination in *Quercus suber* L. *Silvae Genetica* 342, 90-93.
- Marsoni, M., Bracale, M., Espen, L., Prinsi, B., Negri, A.S. & Vannini, C. (2008). Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Vitis vinifera*. *Plant Cell Reports*, 27, 347–356.
- Martin, A., Cuadrado, Y., Guerra, H., Gallego, P., Hita, O., Martin, L., Dorado, A. & Villalobos, N. (2000). Differences in the contents of total sugars, reducing sugars, starch and sucrose in embryogenic and non-embryogenic calli from *Medicago arborea* L. *Int. Science*, 154, 143-151.
- McManus, J.F. (1948). Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology*, 23, 99-108.
- Merkle, S.A. (1995). Strategies for dealing with limitations of somatic embryogenesis in hardwood trees. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 1, 112-121.
- Moose, S.P. & Mumm, R.H. (2008). Molecular Plant Breeding as the Foundation for 21st Century Crop Improvement. *Plant Physiology*, 147, 969–977.
- Motto, M., Thompson, R. & Salamini, F. (1997). Genetic regulation of carbohydrate and protein accumulation in seeds. In Larkins, B.A., Vasil, I.K. (eds.) *Cellular and Molecular Biology of Plant Seed Development* (479–522). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497.
- Natividade, J.V. (1990). *Subericultura* (2ª ed.). Lisboa, DGF. (original publicado em 1950).

- O'Brien, T.P., Feder, N. & McCully, M.E. (1964). Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59, 367-373.
- Parrot, W.A., Dryden, G., Vogt, S., Hildebrand, D.F., Collins, G.B. & Williams, E.G. (1988). Optimization of somatic embryogenesis and embryo germination in soybean. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 24, 817-820.
- Pearse, A.G.E. (1972). *Histochemistry: theoretical and applied* 2 (3<sup>a</sup> ed.). The Williams & Wilkins Company. Baltimore.
- Pinto, G., Valentim, H., Costa, A., Castro, S., Santos, C. (2002). Somatic embryogenesis in leaf callus from a mature *Quercus suber* L. tree. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 38, 569–572.
- Pinto, G., Loureiro, J., Costa, A., Fernandes, P. & Santos, C. (2009). New plants for Cork Oak Landscapes: micropropagation and genetic stability studies. In Kumar, A. & Roy, S., *Plant Tissue Culture and Applied Plant Biotechnology*. Aavishkar Publishers. Jaipur.
- Pinto, G., Silva, S., Neves, L., Araújo, C. & Santos, C. (2010). Histocytological changes and reserve accumulation during somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus*. *Trees*, 24, 763–769.
- Pintus, A (1996). Il sughero della Giara: Produzione e Prospettive di Sviluppo. Atti del Convegno “La Giara e il Sughero” (33-37). Comune di Setzu, Sardegna.
- Puigderrajols, P., Fernández-Guijarro, B., Toribio, M. & Molinas, M. (1996). Origin and early development of secondary embryos in *Quercus suber* L. *International Journal of Plant Sciences*, 157, 674-684.
- Puigderrajols, P., Celestino, C., Suils, M., Toribio, M. & Molinas, M. (2000). Histology of organogenic and embryogenic responses in cotyledons of somatic embryos of *Quercus suber* L. *International Journal of Plant Sciences*, 161, 353–362.
- Puigderrajols, P., Mir, G. & Molinas, M. (2001). Ultrastructure of Early Secondary Embryogenesis by Multicellular and Unicellular Pathways in Cork Oak (*Quercus suber* L.). *Annals of Botany*, 87, 179-189.
- Quiroz-Figueroa, F.R., Rojas-Herrera, R., Galaz-Avalos, R.M., Loyola-Vargas, V.M. (2006). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture*, 86, 285-301.
- Raghavan, V. (2006). *Double fertilization – embryo and endosperm development in flowering plants*. Springer. Berlin.

- Reidiboym-Talleux, L., Sourdioux, M., Grenier, E. & March, G. (2000). Lipid composition of somatic and zygotic embryos from *Prunus avium*. Effect of a cold treatment on somatic embryo quality. *Physiologia Plantarum*, 108, 194–201.
- Reinert, J. (1958). Morphogenese und ihre kontrolle an gewebeulturen aus carotten. *Naturwissenschaften*, 45, 344-345.
- Rohde, A., van Montagu, M., Inzé, D. & Boerjan, W. (1997). Factors regulating the expression of cell cycle genes in individual buds of *Populus*. *Planta*, 201, 43-52.
- Roldão, I.F., Alpuim, M.H. & Bohm (1992) Considerações sobre os resultados já obtidos na propagação vegetativa do sobreiro. *Estacaria e enxertia. Scientia gerundensis*, 18, 85-89.
- 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* (3-26). Springer. Berlin.
- Sané, D., Aberlenc-Bertossi, F., Gassama-Dia, Y.K., Sagna, M., Trouslot, M.F., Duval, Y. & Borgel, A. (2006). Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). *Annals of Botany*, 98, 301-308.
- Schenk, R.U. & Hildebrandt, A.C. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*, 50, 199-204.
- Sharp, W.R., Sondahl, M.R., Caldas, L.S. & Maraffa, S.B. (1980). The physiology on in vitro asexual embryogenesis. *Horticultural Reviews*, 2, 268-310.
- Spurr, A.R. (1969). A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research*, 26, 31-43.
- Srivastava, P. & Steinhauer, A. (1982). In vitro culture of embryo segments of *Quercus lebani*: organogenesis and callus growth as a differential response to experimental conditions. *Z Pflanzenphysiol.*, 106, 93-96.
- 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.
- Steward, F., Mapes, M. & Smith, J. (1958). Growth and organized development of cultured cells. I. growth and division of freely suspended cells. *American Journal of Botany*, 45, 693-703.

- Sun, H., Aidun, C.K.M. & Egertsdotter, U. (2010). Effects from shear stress on morphology and growth of early stages of Norway Spruce somatic embryos. *Biotechnology and Bioengineering*, 105, 588-599.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2006). *Fisiologia Vegetal* (3ª ed.). Artmed. Porto Alegre.
- Thomas, C. & Jiménez, V.M. (2005). Mode of action of plant hormones and plant growth regulators during induction of somatic embryogenesis: molecular aspects. In: Mujib, A. & Samaj, J. (Eds.), *Somatic embryogenesis* (157-176). Springer. Berlin.
- Toribio, M. (1986). Callus initiation and primary morphogenic responses from *Quercus suber* L. cotyledons cultured in vitro. IUFRO World Congress. Slovenia.
- Toribio, M. & Celestino, C. (1989). Cultivo in vitro del alcornoque. *Scientia Gerundensis*, 15, 11-21.
- Toribio, M., Celestino, C., Gellego, J. & Martinez, I. (1999) Induction of somatic embryogenesis in tissues from mature oak trees. In: O'Riordain, F. (Ed.) *Development of integrated systems for large scale propagation of elite plants using in vitro techniques* (236-237). Office for Official Publications of the European Communities. Luxemburg.
- Toribio, M., Celestino, C. & Molinas, M. (2005). Cork oak, *Quercus suber* L. In: Protocol for somatic embryogenesis in woody plants (445-458). In Jain, S.M. (Ed.), *Forestry Sciences* 77.
- Torres JR (1979) *Árboles y Arbustos de la España Peninsular*. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes. Madrid.
- Varela, M.C. & Eriksson, G. (1995). Multipurpose Gene Conservation in *Quercus suber* – a Portuguese example. *Silvae Genetica*, 44, 28-37.
- van Hengel, A.J., Tadesse, Z., Immerzeel, P., Schols, H., van Kammen, A. & de Vries, S.C. (2001). N-Acetylglucosamine and Glucosamine-containing Arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis. *Plant Physiology*, 125, 1880-1890.
- von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J. & Filonova, L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69, 233-249.
- Wilhelm, E. (2000). Somatic embryogenesis in oak (*Quercus* spp.). In *Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 36, 349-357.



- Williams, E. & Maheswaran, G. (1986). Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany*, 57, 443-462.
- Wise, J. & Tunnacliffe, A. (2004). POPP the quest: what do LEA proteins do? *Trends in Plant Science*, 9, 13-17.
- Zhang, J., Ma, H., Chen, S., Ji, M., Perl, A., Kovacs, L. & Chen, S. (2009). Stress response proteins' differential expression in embryogenic and non-embryogenic callus of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon – A proteomic approach. *Plant Science*, 177, 103–113.
- Zöllner, N. & Kirsh, K. (1962). Über die quantitative bestimmung von lipoiden (mikromethode) mittels der vielen natürlichen lipoiden (allen bakannten plasmalipoiden) gemeinsamen sulphosphovanillin-reaktion. *Zeitschrift für die gesante experimentelle Medizin*, 135, 545-561.