



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LIRIO LUIZ DAL VESCO

**INDUÇÃO E CONTROLE DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA *IN VITRO* NA
GOIABEIRA SERRANA (*Feijoa sellowiana* Berg)**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.
Orientador: Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra

Florianópolis

1998

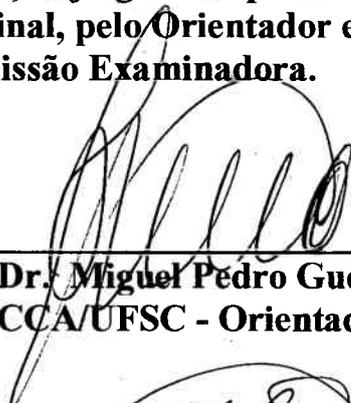
“INDUÇÃO E CONTROLE DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA *IN VITRO* NA GOIABEIRA SERRANA (*FEIJOA SELLOWIANA* BERG)”

POR

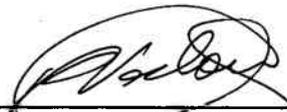
LIRIO LUIZ DAL VESCO

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e membros da Comissão Examinadora.

Comissão Examinadora:



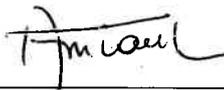
**Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra
(FIT/CCA/UFSC - Orientador)**



**Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari
(FIT/CCA/UFSC – Membro Titular)**



**Dr. Mário Vidor
(EPAGRI/Lages – Membro Titular)**



**Profa. Dra. Ana Maria Viana
Coordenadora, em exercício, do Curso de
Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC**

Florianópolis, maio de 1998

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra pela ampla e objetiva orientação e principalmente pela amizade e confiança conquistada antes e durante este trabalho.

Ao Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari pelo apoio e auxílio no desenvolvimento deste trabalho e na coordenação junto ao Laboratório de Fisiologia e desenvolvimento Genético Vegetais

Ao Prof. Dr. Maurício Sedrez dos Reis pelos ensinamentos e auxílios às análises estatísticas.

Às funcionárias do LFDGV, Maria Luiza e Denise pela disposição, prestatividade e auxílios no desenvolvimento dos trabalhos.

A todo pessoal do LFDGV que de uma forma ou de outra contribuiu para o trabalho de grupo.

Aos meus familiares pelos ensinamentos, auxílio e compreensão, antes e durante a realização deste trabalho, especialmente a minha esposa Caty e minha filha Emanuela, a quem dedico este trabalho.

À coordenação do curso e à CAPES pela concessão da bolsa de estudos e auxílios financeiros na participação de congressos.

**“Jamais rastejarei -
meu mundo é o universo”**

Ludwig van Beethoven
(1770-1827)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. objetivos específicos	3
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
3.1. Micropropagação da goiabeira serrana por organogênese.....	4
3.2. Embriogênese Somática.....	5
3.2.1. Histórico e conceito	5
3.2.2. Padrão e controle da embriogênese somática.....	6
3.2.3. Explantes	7
3.2.4. Condições de cultivo e meios de cultura.....	9
3.2.5. Fitorreguladores	10
3.2.6. Nitrogênio e aminoácidos	11
3.2.7. Maturação e conversão dos embriões somáticos	13
3.2.8. Sementes Sintéticas.....	15
3.2.9. Embriogênese somática na goiabeira serrana.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1. Material Vegetal	20
4.2. Condições de cultivo	20
4.3. Metodologia.....	20
4.3.1. Indução à Embriogênese Somática	20
4.3.1.1. Seleção de acessos	21
4.3.1.2. Definição das Formulações Salinas.....	21
4.3.1.3. Fontes de nitrogênio inorgânico e orgânico	22
Influência do NH_4^+ , NO_3^- e glutamina.....	22
Fontes e níveis de aminoácidos.....	23
4.3.1.4. Influência de pulsos de 2,4-D	23
4.3.1.5. Estádio de desenvolvimento dos embriões zigóticos	24
4.3.1.6. Tempo de armazenamento dos embriões zigóticos	24
4.4. Linhagens celulares embriogênicas.....	25
4.4.1. Indução e Estabilização.....	25
4.4.2. Multiplicação.....	25
4.4.3. Manutenção.....	26
4.4.4. Maturação de linhagens celulares	26
4.5. Caracterização histoquímicas.....	27
4.6. Conversão de Embriões Somáticos.....	27
4.7. Produção de sementes sintéticas em cápsulas de hidrogel.....	28
4.7.1. Material Vegetal.....	28
4.7.2. Metodologia.....	28
4.8. Acimatação das plântulas	28
4.9. Análises estruturais	29
4.10. Análise estatística.....	29

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1. Indução à Embriogênese Somática	30
5.1.1. Acessos.....	31
5.1.2. Otimização do meio de cultura básico	32
5.1.2.1. Definição da formulações salinas	32
5.1.2.2. Fontes de nitrogênio inorgânico e orgânico	36
Influência dos níveis de NH_4^+ , NO_3^- e Gln	36
Fonte de aminoácidos	40
Níveis de Gln	41
5.1.3. Influência do tempo de exposição ao 2,4-D.....	42
5.1.4. Estádio de desenvolvimento dos EZ.....	43
5.1.5. Viabilidade dos EZ durante o armazenamento a frio	45
5.1.6. Análise histológica.....	45
5.2. Linhagens Celulares	
5.2.1. Indução, estabilização e Multiplicação.....	47
5.2.2. Maturação	50
5.3. Análise histoquímica.....	52
5.4. Conversão de Embriões Somáticos.....	53
5.5. Sementes Sintéticas.....	55
5.6. Aclimatização de plântulas	57
6. SÍNTESE DOS PRINCIPAIS RESULTADOS.....	58
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	60
8. CONCLUSÃO	61
FIGURAS e TABELAS.....	62
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

LISTA DE FIGURAS

1. Processo de dois ciclos para a indução e modulação da embriogênese somática, adaptado de Durzan (1988)63
2. a) Percentagem de explantes com embriões somáticos (% de ES) e b) número de embriões somáticos por explante (número de ES) a partir de EZ de em cinco acesso de *Feijoa sellowiana* Berg, cultivados em meio de cultura LPm (von Arnold & Eriksson, 1981), adicionado de 2,4-D (20 μ M), cinco, dez e quinze semanas após a inoculação.64
3. a) Percentagem de indução a embriogênese somática (% de ES) e b) Número de embriões somáticos por explante (número de ES) em função do tempo a partir de embriões zigóticos do acesso 101 de *Feijoa sellowiana* Berg, em resposta à Gln (0 e 4mM), adicionada ao meio de cultura LPm (von Arnold & Eriksson, 1981), MS (Murashige & Skoog, 1962) e WPM (Lloyd & McCown, 1980) suplementado com 2,4-D (10 e 20 μ M).65
4. a) Percentagem de explantes com embriões somáticos (% de ES) e b) Número de embriões somáticos por explante (número de ES) em função do tempo, a partir de EZ do acesso 101 de *Feijoa sellowiana* Berg, em resposta à Gln (0 e 4 mM), adicionada à formulação salina LPm (von Arnold & Eriksson, 1981) modificada para diferentes proporções de $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$66
5. Percentagem de indução a embriogênese somática (% de ES) e número de embriões somáticos por explantes (número de ES) a partir de EZ do acesso 101 de *Feijoa sellowiana* Berg, em resposta à adição de 4 mM dos aminoácidos Gln, Asn e Arg ao meio de cultura basal LPm (von Arnold & Eriksson, 1981), suplementado com 2,4-D (10 μ M).67
6. Percentagem de indução da embriogênese somática (% de ES) e número de ES por explantes (número de ES) em função da concentração em mM de Gln, a partir de EZ do acesso 101 de *Feijoa sellowiana* Berg, cultivados em meio de cultura LPm (von Arnold & Eriksson, 1981), adicionado de 2,4-D (10 μ M).67
7. a) Percentagem de indução da embriogênese somática (% de ES) e b) número de embriões somáticos por explante (número de ES) a partir de EZ do acesso 101 de *Feijoa sellowiana* Berg, em resposta a pulses de 1; 2; 4; 8 e 16 semanas em 2,4-D (20 μ M), em meio de cultura basal LPm (von Arnold & Eriksson, 1981) e glutamina (4 mM), aos cinco, dez, quinze e vinte semanas após a inoculação.68
8. Evolução da indução da embriogênese somática (% de ES) em função do tempo, a partir de EZ do acesso 101 de *Feijoa sellowiana* Berg, em resposta a pulses de 1; 2; 4; 8 e 16 semanas em 2,4-D (20 μ M) em meio de cultura basal LPm (von Arnold & Eriksson, 1981), suplementado com Gln (4 mM), aos cinco, dez, quinze e vinte semanas após a inoculação.69
9. a) Evolução da percentagem de embriogênese somática (% de ES) e b) evolução do número de embriões somáticos por explante (número de ES) a partir de embriões zigóticos coletados de frutos em diferentes estádios de maturação (dias após a antese), do acesso 101 de *Feijoa sellowiana* Berg, em resposta ao meio de cultura LPm (von Arnold & Eriksson, 1981), adicionado de 2,4-D (20 μ M) e Gln (4 mM), dez e quinze semanas após a inoculação.70
10. Evolução da percentagem da embriogênese somática (% de ES) e número de

- embriões somáticos por explantes (número de ES) em resposta a diferentes períodos de armazenamento (meses a 4° C) dos embriões zigóticos, do acesso 101 de *Feijoa sellowiana* Berg, em resposta ao meio de cultura LPm (von Arnold & Eriksson, 1981), adicionado de 2,4-D (20µM) e glutamina (4mM), dez semanas após a inoculação.....71
11. Curvas de crescimento de linhagens celulares embriogênicas (LCE) (volume médio sedimentado em função do tempo) do acesso 101 de (*Feijoa sellowiana* Berg), cultivadas em meio de cultura LPm (von Arnold & Eriksson, 1981) adicionado de uma combinação de 2,4-D (D) (1 e 2 µM), 2iP (I) (1 µM) e LPm livre de fitorreguladores. **a)** inóculo de 5 ml de suspensão celular, em cinquenta e três dias de incubação; **b)** Média de 1,4g de massa celular embriogênica, em quarenta e um dias de incubação.....72
12. Rotas de obtenção e desenvolvimento de culturas embriogênicas de *Feijoa sellowiana* Berg.....73
13. **a)** Estádios de desenvolvimento dos ES de *F sellowiana* (G = globular; C = cordiforme; TP = torpedo precoce; T = torpedo; PCT = pre-cotiledonar e CT = cotiledonar) (x 2,5); **b)** embriogênese somática em estádios de G e C, cinco semanas após a inoculação (x 3,1); **c)** ES sincrônica e de alta freqüência nos estádios TP-T, sete semanas após a inoculação (x 1,9), **d)** ES sincrônica nos estádios de PCT (x 1,9); **e)** ES assincrônicos nos estádios CT e CTT = cotiledonar tardio (x 1,25); **f)** ES de baixa freqüência (x 1,25).....74
14. Indução da ES a partir de meios de cultura basal LPm contendo: **a)** proporção de 100 % de NO₃⁻ (x1,9); **b)** Proporção de 100 % de NH₄⁺ com baixa proliferação celular (x 1,25); **c)** Proporção zero de N. Notar massa celular escura; **d)** presença de Gln como única fonte de N. Notar massa celular friável e ES de baixa freqüência (x 2,5); **e)** Indução e desenvolvimento de ES direta com pulso de duas semanas em 2,4-D (x 1,25), **f)** Progressão rápida para estádios cotiledonares em meio de cultura isento de 2,4-D (x 1,25).....75
15. **a)** Corte longitudinal da folha cotiledonar mostrando a ES direta sobre a epiderme, aos dezesseis dias de cultivo (x 33); **b)** ES globulares surgindo da camada da epiderme e sub-epiderme aos 24 dias (x 66) e **c)** divisões periclinais e anticlinais (x 66), e **d)** ES cordiformes sobre a camada epidérmica, aos 24 dias (x 33); **e)** ES indireta originada sobre massa celular embriogênica, 30 dias (x 66), e **f)** ES pré-cotiledonar e cotiledonares de alta freqüência, originados sobre a camada da epiderme, 70 dias após a inoculação (x 33). c = cordiforme; ct = cotiledonar; da = divisões anticlinais; dp = divisões periclinais; es = embriões somáticos; ep = epiderme; g = globular; pc = pró-cambio; pct = pré-cotiledonar; sep = subepiderme; sp = suspensor.....76
16. **a)** Indução de massas celulares embriogênicas (setas) em meio de cultura basal contendo 2,4-D (20 µM), 70 dias após a inoculação (x 1,25); **b)** Massa celular de multiplicação rápida (seta) com característica friável e granular (x 1,9); **c)** ES repetitiva com estruturas granulares compostas de embriões somáticos globulares (x 2,5); **d)** Massa celular (calo) não embriogenética (seta); **e)** Linhagem celular embriogênica transferida para meio de cultura geleificado revelando alta taxa de regeneração (x 3,1); Massas celulares de tamanho maiores (setas menor) com baixa taxa de regeneração e de tamanho menores (seta maior) com maior potencial de multiplicação.....77
17. **a)** Linhagem celular embriogênica (LCE) subcultivada em 2,4-D (3-5 µM) com

- perda parcial da capacidade embriogênica (x 1,9); **b)** LCE de baixa capacidade de regeneração; **c)** LCE originada em meio de cultura basal LPm, líquido e isento de fitorreguladores, transferidas para o mesmo meio de cultura basal geleificado com início de maturação (x 1,9), e **d)** LCE permanentemente subcultivada em meio basal geleificado, promovendo a maturação de ES de forma sincrônica e alta frequência (x 2,5); **e)** LCE com cinco subcultivos em meio de cultura basal líquido e isento de fitorreguladores, quando transferidas para meio de cultura basal geleificado, adicionado de 2-iP (5 μ M) e posteriormente repicados para o mesmo meio basal contendo ABA e/ou PEG, promoveram a maturação de ES (setas) de baixa frequência (x 1,9), e **f)** quando mantidas na presença de 2,4-D não maturaram, permanecendo em constante proliferação (x 1,9). 78
18. Análises histoquímicas das linhagens celulares originadas do meio de multiplicação em suspensão celular revelaram características de células embriogênicas: **a)** Células embriogênicas de tamanho pequeno (20-30 μ M), isodiamétricas com citoplasma denso (seta) e formando aglomerados (x 33); **b)** Células embriogênicas apresentando forte reação ao Carmin Acético (2%); com núcleo grande, indicado pelas nucleoproteínas e organelas (setas); demonstrando alta capacidade de divisão celular (x 330); **c)** Células (seta) apresentando acúmulo de grãos de amido (x 330); **d)** Células (seta) com presença de corpos lipídicos (x 330); **e-f)** Linhagem celular embriogênicas apresentando a evolução da fase de maturação dos ES: **e)** Processo de organização de estruturas, observadas pelo aglomerado de células e fortemente coradas com Carmim Acético (x 66), **f)** que se condensam em estruturas maciças característico de ES pré-globulares e globulares de forma repetitiva (x 33). a = amido; ag = aglomerados de células; eg = embrião globular; cl = corpos lipídicos ; n = núcleo; pe = pró-embrião. 79
19. Conversão de ES em meio de cultura basal LPm, adicionado de BAP (0,5 μ M) e GA₃ (0,1 μ M): **a)** Emissão da radícula, uma semana após a inoculação (x 1,25) e **b)** abertura do cotilédone duas semanas após a inoculação (x 1,9) **c)** Plântulas germinadas a partir de sementes sintéticas em cápsulas de hidrogel; abertura da cápsula pela descomplexação do Ca⁺⁺ com KNO₃ (x 2,5), **d)** Quando tratadas com água, as cápsulas mantiveram-se numa consistência firme permitindo a emissão da radícula para fora (x 1,9); **e)** ES convertidos em plântulas completas (x 1,25); **f)** Plântulas completas originadas do meio de germinação. 80

LISTA DE TABELAS

1. Composição e concentração (mg/l e mM) das formulações salinas utilizadas nos meios de cultura básico.....81
2. Resumo da análise da variância da percentagem de explante com ES (% de ES) e do número de ES por explante (Nº. de ES), para cinco acessos de *F sellowiana* Berg, cultivados em meio de cultura LPm (von Arnold & Eriksson, 1981), adicionado de 2,4-D (20 µM), cinco, dez e quinze semanas após a inoculação..... 82
3. Resumo da análise da variância para a percentagem de explante com ES (% de ES) e do número de ES por explante (Nº. de ES), originados a partir de EZ imaturos extraídos de frutos com 75 a 120 dias após a antese, do acesso 101 de *F. sellowiana* Berg, em meio de cultura com diferentes formulações salinas, adicionado de 2,4-D (10 e 20 µM) e Gln (0 e 4 mM), cinco, dez, quinze e vinte semanas após a inoculação.....83
4. Percentagem de explantes com ES (% de ES) a partir de EZ imaturos do acesso 101 de *F. sellowiana* Berg, cultivados nas formulações salinas: LPm (von Arnold & Eriksson, 1981), MS (Murashige & Skoog, 1962) e WPM (Lloyd & McCown, 1980) adicionado de 2,4-D (10 e 20 µM) e Gln (0 e 4 mM), cinco, dez, quinze e vinte semanas após a inoculação.....84
5. Número de embriões somáticos por explante (número de ES) a partir de EZ imaturos do acesso 101 de *F. sellowiana* Berg, cultivados nas formulações salinas: LPm (von Arnold & Eriksson, 1981), MS (Murashige & Skoog, 1962) e WPM (Lloyd & McCown, 1980) adicionado de 2,4-D (10 e 20 µM) e Gln (0 e 4 mM), cinco, dez, quinze e vinte semanas após a inoculação.85
6. Resumo da análise da variância para a percentagem de explante com ES (% de ES) e número de ES por explante (Nº. de ES) a partir de EZ imaturos do acesso 101 de *F. sellowiana* Berg, em meio de cultura LPm (von Arnold & Eriksson, 1981) contendo diferentes proporções de $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$, adicionado de Gln, cinco, dez, quinze e vinte semanas após a inoculação.86
7. Percentagem de explante com ES (% de ES) a partir de EZ imaturos do acesso 101 de *Feijoa sellowiana* Berg, em meio de cultura LPm (von Arnold & Eriksson, 1981) contendo diferentes proporções de $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ (00:00; 00:49; 15:34; 34:15 e 49:00 mM), e adicionado de Gln (0 e 4 mM). e 2,4-D (20 µM), cinco, dez, quinze e vinte semanas após a inoculação.87
8. Número de embriões somáticos por explante (número de ES) a partir de EZ imaturos do acesso 101 de *F. sellowiana* Berg, em meio de cultura LPm (von Arnold & Eriksson, 1981) contendo diferentes proporções de $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ (00:00; 00:49; 15:34; 34:15 e 49:00 mM), adicionado de Gln (0 e 4 mM) e 2,4-D (20 µM), cinco, dez, quinze e vinte semanas após a inoculação.88
9. Resumo da análise da variância para a percentagem de explante com ES (% de ES) e número de ES por explante (Nº. de ES), do acesso 101 de *F. sellowiana* Berg, em resposta à suplementação com os aminoácidos Asp, Arg e gln ao meio de cultura basal LPm (von Arnold & Eriksson, 1981), adicionado de 2,4-D (10 µM), dez semanas após a inoculação.....89
10. Resumo da análise da variância para a percentagem de explante com ES (% de ES) e número de ES por explante (Nº. de ES) do acesso 101 de *F. sellowiana*

Berg, em resposta a diferentes níveis de gln adicionado ao meio de cultura basal LPm (von Arnold & Eriksson, 1981) e 2,4-D (10 μ M), dez semanas após a inoculação.....	89
11. Resumo da análise da variância para a percentagem de explantes com ES (% de ES) e do número de ES por explante (Nº de ES), do acesso 101 de <i>F. sellowiana</i> Berg, em resposta a pulses de 1; 2; 4; 8 e 16 semanas em 2,4-D (20 μ M) em meio de cultura basal LPm (von Arnold & Eriksson, 1981), adicionado de gln (4 mM), cinco, dez, quinze e vinte semanas após a inoculação.....	90
12. Resumo da análise da variância para a percentagem de explante com ES (% de ES) e o número de ES por explante (Nº. de ES) a partir de EZ coletados em diferentes estádios de maturação dos frutos (dias após a antese), do acesso 101 de <i>F. sellowiana</i> Berg, em resposta ao meio de cultura LPm (von Arnold & Eriksson, 1981), adicionado de 2,4-D (20 μ M) e gln (4 mM), cinco, dez e quinze semanas após a inoculação.....	91
13. Resumo da análise da variância para a percentagem de explante com ES (% de ES) e número de ES por explante em resposta a diferentes períodos de armazenamento (meses a 4° C) das sementes do acessos 101 de <i>F. sellowiana</i> Berg, dez semanas após a inoculação.....	91
14. Resumo da análise da variância para a percentagem de conversão de ES em plântulas completas, cotilédones abertos, emissão radicular e sem resposta, do acesso 101 de <i>F. sellowiana</i> Berg, em meio de cultura LPm, adicionados de diferentes citocininas combinados com GA ₃ , duas semanas após a inoculação.....	92
15. Percentagem de conversão de ES em plântulas completas, cotilédone aberto, emissão radicular e sem resposta, do acesso 101 de <i>F. sellowiana</i> Berg, em meio de cultura LPm (von Arnold & Eriksson, 1981) adicionados de BAP (0; 0,5 μ M), Kin (0,5 μ M) e 2iP (0,5 μ M) combinados com GA ₃ (0; 0,1 μ M), duas semanas após a inoculação.....	93
16. Resumo da análise da variância da percentagem de conversão de ES em plântulas completas, cotilédones abertos, emissão radicular e sem resposta, do clones 101 de <i>F. sellowiana</i> Berg, em meio de cultura adicionado de BAP e GA ₃ , duas semanas após a inoculação.....	94
17. Percentagem de conversão de ES em plântulas completas, cotilédones abertos, emissão radicular e sem resposta, do acesso 101 de <i>F. sellowiana</i> Berg, em meio de cultura LPm (von Arnold & Eriksson, 1981) adicionados de BAP (0,25; 0,5; 1,0 μ M), combinados com GA ₃ (0,1 e 0,5 μ M), duas semanas após a inoculação.....	95
18. Resumo da análise da variância para a percentagem de conversão de sementes sintéticas em plântulas completas, emissão radícula, cotilédones abertos, sem resposta e cápsula contaminada, do acesso 101 de <i>Feijoa sellowiana</i> Berg, em diferentes composições de endosperma artificial (EA) e tratamentos de abertura de cápsulas, em quinze dias após a transferência para sala de incubação.....	96
19. Percentagem de conversão de sementes sintéticas em plântulas completas, emissão radicular, cotilédones abertos, sem resposta e cápsulas contaminadas, a partir de ES do acesso 101 de <i>Feijoa sellowiana</i> Berg, em diferentes composições de endosperma artificial ¹ (EA) e tratamentos de abertura de cápsulas com H ₂ O e KNO ₃ (200 mM), quinze dias após a transferência para sala de incubação.....	97
20. Resumo das significâncias dos modelos matemáticos e dos coeficientes, para as análises de regressão.....	98

ABREVIATURAS UTILIZADAS

2,4-D = 2,4- diclorofenoxiacético

2-iP - 2-isopenteniladenina

ABA = ácido abscísico

AIB = ácido Indolilbutírico

ANA = ácido naftalenoacético

Arg = arginina

Asn = L-asparagina

BAP = 6-benzilaminopurina

CH = Caseína hidrolisada

CV (%) = coeficiente de variação

ES = embriões somáticos

EZ = embriões zigóticos

GA₃ = ácido Giberélico

Gln = L-glutamina

Kin = cinetina

LFDGV = Laboratório de Fisiologia e desenvolvimento Genético Vegetais

LP = von Arnold & Eriksson, 1977

LPm = von Arnold & Eriksson, 1981

MS = Murashige & Skoog, 1962

PEG = polietilenoglicol com peso molecular 8.000

TDZ = tidiazuron

WPM = Lloyd & McCown, 1980

RESUMO

Embriões zigóticos excisados de frutos de cinco acessos *Feijoa sellowiana* ou *Acca sellowiana* Berg, coletados em diferentes estádios de desenvolvimento foram avaliados quanto ao seu potencial embriogenético. Testou-se as formulações salinas LPm, MS e WPM, adicionadas de 2,4-D (10 e 20 μM) e Gln (0 e 4mM). Em segundo ensaio foram alteradas as proporções dos íons NH_4^+ e NO_3^- da formulação LPm adicionada ou não com Gln (0 e 4 mM) e de 2,4-D (20 μM). Estudou-se também os efeitos da suplementação ao meio basal LPm contendo 10 μM de 2,4-D de 4 mM de Asn, Gln e Arg, bem como de cinco níveis de Gln (0; 2; 4; 6 e 8 mM). Pulsos de 2,4-D (20 μM) foram utilizados para verificar a competência embriogênica dos explantes. Diferentes ensaios de indução, multiplicação, maturação e conversão dos ES, bem como para a produção de sementes sintéticas, foram instalados. Estudou-se também as condições para o estabelecimento de linhagens celulares embriogenéticas. Avaliações histoquímicas e histológicas foram feitas para caracterizar os processos morfogênicos *in vitro*. A maior percentagem de indução da ES e o maior número de ES ocorreram nos clones 101 e 50-4. A formulação salina LPm adicionada de 2,4-D (10 ou 20 μM) e suplementada com Gln (4 mM) resultou em valores elevados de indução embriogenética. Os níveis originais dos íons NH_4^+ e NO_3^- existentes no meio LPm, suplementado com Gln (4 mM) resultou na produção de um número elevado de ES (27,2). A adição de Asn, Gln ou Arg ao meio LPm resultou em valores elevados de indução e produção de ES, em relação aos valores obtidos com meio isento destes aminoácidos. Pulsos de duas semanas com 2,4-D foram suficientes para proporcionar valores comparativos de indução e produção de ES, àqueles obtidos com pulsos de 4 e 8 semanas. As maiores intensidades de resposta embriogenética dos EZ parecem estar associadas com os frutos cujas sementes encontram-se em maturação fisiológica. Sementes armazenadas a 4° C, mantiveram alto potencial de indução e produção de ES por um período de até 12 meses. O estabelecimento e multiplicação de linhagens celulares embriogenéticas foram otimizados em meio basal LPm líquido adicionando 2,4-D (2 μM) e 2iP (1 μM) ou no mesmo meio basal geleificado. Neste caso, concentrações de 3 e 5 μM de 2,4-D induziram a perda do potencial embriogenético, enquanto que o nível de 1 μM de 2,4-D ou a ausência deste, permitiram a maturação dos ES. A dinâmica de crescimento das suspensões celulares revelou um incremento de 21,7 vezes, após 50 dias em meio de cultura LPm contendo 2,4-D (1 μM) e 2iP (1 μM). A alternância de repicagens das linhagens celulares em meio basal LPm líquido e geleificado foi fundamental para a multiplicação destas linhagens em suspensão, mas não para as linhagens mantidas em plaqueamento. Linhagens celulares mantidas em meio basal LPm líquido, isento de fitorreguladores, repicadas para o mesmo meio basal geleificado e suplementado com 2-iP (5 μM) e posteriormente repicadas para o mesmo meio basal adicionado de ABA (10 μM) ou PEG (10 mM) foram induzidas à progressão para estágios embriogenéticos e maturação dos ES. As melhores taxas de conversão de ES em plântulas foram obtidas em meio basal LPm contendo BAP (0,25 ou 0,5 μM) e/ou combinado com GA_3 (0,1 μM). Sementes sintéticas com endosperma artificial contendo meio basal $\frac{1}{2}$ LPm, vitaminas de Morel, CH (500 mg/l), Kin (0,5 μM) e GA_3 (0,05 μM) e submetidas à descomplexação do Ca^{++} com KNO_3 (200 mM) por 30 min resultou na conversão de 51,2% de plântulas. Estudos histoquímicos e histológicos demonstraram a evolução dos processos morfogênicos *in vitro*.

ABSTRACT

Zygotic embryos excised from different developmental stages of five *Feijoa sellowiana* or *Acca sellowiana* accession were evaluated for their embryogenic potential. In the first experiment it was tested the basal salt formulation based on LPM, MS and WPM supplemented with 2,4-D (10 and 20 μM) and Gln (0 and 4 mM). In the second experiment it was studied the modification of the $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ ionic proportion of the basal LPM, supplemented with 2,4-D (20 μM) and Gln (0 e 4 mM). In the sequence, the effects of the addition of 4 mM of Asn, Gln e Arg and five levels of Gln to the basal LPM medium supplemented with 10 μM 2,4-D, as well time pulses of 2,4-D (20 μM) were evaluated for the competence, induction and expression of SE in this species. Different experiment were established in order to determine the best protocol for the induction, stabilization, scale-up and maturation of embryogenic cell lines, as well for the conversion of SE to plantlets, and for the improvement in the synthetic seed technology. Histochemical and histologic evaluation were performed in order to identify patterns of *in vitro* morphogenesis. High rates of ES induction were observed in the clones 101 e 50-4. The LPM basal salt formulation supplemented with 2,4-D (10 or 20 μM) and Gln (4 mM). The original $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ proportion present in the LPM medium supplemented with Gln (4 mM) resulted in the higher ES production (27,2/explant). The addition of Asn, Gln or Arg to the basal LPM medium resulted in high values of ES induction and production as compared to medium devoid of these aminoacids. Two weeks pulses of 2,4-D pulses induced SE in the same intensity of the values observed with 4 and 8 weeks pulses. High SE was observed to be associated with explants excised from seeds in physiologic maturation. Seeds kept in low temperature (4° C) maintained high rates of SE induction and production after 12 month of storage. The establishment and scale-up of embryogenic cell lines were observed in the basal LPM liquid or solid medium supplemented with 2,4-D (2 μM) and 2-iP (1 μM), and with 2,4-D (1 μM) and 2-iP (1 μM), respectively. In this case the same basal medium supplemented with 3 or 5 μM 2,4-D resulted in reduced SE potential of the embryogenic cell line, while medium supplemented with 1 μM 2,4-D or free of this auxin allowed the maturation of SE. The growth dynamic of the embryogenic cell line in basal LPM liquid medium supplemented with 2,4-D (1 μM) and 2-iP (1 μM) revealed an increment of 21.7 times after 50 days in culture. The alternation of liquid and solid medium was essential for the multiplication and maintenance of the embryogenic potential of the cell line initially cultivated in liquid medium, but was not essential for that cell lines plated in solid medium. Embryogenic cell lines cultivated in the LPM liquid medium devoid of growth regulators, subcultivated to the same basal solid medium supplemented with 2-iP (5 μM) and subsequently cultivated in the same basal medium supplemented with ABA (10 μM) or PEG (10 mM) were induced to the progression to late embryogenetic stages and the maturation of SE. The higher rates of SE conversion were observed in the basal LPM solid medium supplemented with BAP (0.25 or 0.5 μM), combined or not with GA_3 (0.1 μM). Synthetic seeds containing artificial endosperm composed of $\frac{1}{2}$ LPM salts, Morel vitamins, CH (500 mg/l), Kin (0.5 μM), and GA_3 (0.05 μM) and submitted to KNO_3 (200 mM) during 30 min showed the higher rate of conversion to plantlets (51.2 %). Histochemical studies showed the accumulation of lipid and starch bodies in the embryogenic cells. Histological studies revealed the direct origin of the somatic embryos.

1. INTRODUÇÃO

A goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana* Berg) é uma Mirtaceae, da subtribo Feijoidéae Berg, nativa do planalto meridional brasileiro, sendo encontrada também no Uruguai e na Argentina (Soh, 1985 e Mattos, 1990). No sul do Brasil esta espécie já é cultivada comercialmente, sendo também encontrada em pomares não comerciais. Além do interesse de seus frutos, ela pode ser utilizada como uma planta ornamental, por apresentar flores e folhagens vistosas (Legrand & Klein, 1977). Em Santa Catarina ela ocorre espontaneamente nos campos da região serrana em altitudes acima de 800m (Ducroquet & Ribeiro, 1991), muito freqüentemente ao abrigo da *Araucaria angustifolia*, nas orlas dos capões, raramente no interior e complementemente ausente nos locais densos e sombrios (Legrand & Klein, 1977).

O fruto assemelha-se ao da goiaba comum (*Psidium guajava*) na aparência, tamanho e textura. Apresenta porém, sabor diferenciado, doce-acidulado e excelente aromaticidade (Soh, 1985 e Ducroquet & Ribeiro, 1991). Levantamentos de populações naturais efetuadas por Ducroquet & Ribeiro (1991), evidenciaram a existência de grande variabilidade dentro da espécie, principalmente quanto às características de tamanho de fruto e a espessura da casca. Esta espécie apresenta fecundação cruzada (Evreinoff, 1955; Pugliano, 1980 e Soh, 1985) e a polinização é realizada por várias espécies de pássaros (Ducroquet & Hickel, 1997). Em conseqüência, indivíduos portadores de características diferentes dos genitores são esperados na progênie.

A introdução desta espécie na Europa e Nova Zelândia, no século passado e início deste século aumentou o interesse de produtores e melhoristas. Atualmente existem plantios comerciais com variedades melhoradas na Nova Zelândia e EUA (Ducroquet & Hickel, 1997), em países do mediterrâneo e da antiga URSS, notadamente na Geórgia. Cultivos comerciais desta espécie ocorrem em intensidade variada na Nova Zelândia. Existem também cultivos comerciais na Colômbia e no Chile (Jordan, M., Comunicação Pessoal).

Países da comunidade européia, como a França, Itália, Espanha e Portugal, estão interessados na obtenção de novos materiais (Canhoto & Cruz, 1996a). Entretanto, devido a base genética estreita do germoplasma desta espécie nestes países, ainda não foi possível a criação de cultivares que produzissem frutos de qualidade suficiente para conquistar o mercado (Ducroquet & Ribeiro, 1996).

Sendo o planalto catarinense o centro de origem da espécie, esta não apresenta problemas de adaptação e deste modo, seu plantio comercial é uma alternativa muito promissora para atender o mercado interno e de exportação. Em função disto, esta sendo

implantado um banco de germoplasma no CTA de São Joaquim (EPAGRI/SC), com projeto inserido no Programa Nacional de Recursos Genéticos da EMBRAPA, em sua maioria com clones nativos da região serrana. Também, em convênio entre a EPAGRI e o Departamento de Fitotecnia do CCA/UFSC, estão sendo desenvolvidos trabalhos de pesquisas multidisciplinares na forma de um projeto integrado de domesticação da goiabeira serrana, com ênfase na área de melhoramento genético e cultivo *in vitro*.

Trabalhos de caracterização de variabilidade genética da goiabeira serrana através de marcadores moleculares, estão sendo desenvolvidos pelo Departamento de Fitotecnia do CCA/UFSC. Nestes trabalhos busca-se a identificação de características associadas a resistência a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), tamanho e formato do fruto, aparência, consistência e relação interna/externa do pericarpo. Os primeiros resultados revelaram um alto nível de variabilidade genética entre os acessos, detectados por marcadores morfológicos e alozímicos, indicando um grande potencial para o melhoramento da espécie (Nodari et al., 1997).

A propagação vegetativa convencional desta espécie, baseada na estaquia, apresenta baixa eficiência (Duarte et al., 1992; Fachinello et al., 1992). Aparentemente a alta fenolização impede um bom enraizamento. A propagação por enxertia apresenta também resultados pouco consistentes (Fachinello et al., 1992). Um dos fatores é a contaminação por fungos, especialmente *C. gloeosporioides*, cujo desenvolvimento é favorecido pelo ambiente quente e úmido da casa de vegetação, passo necessário para assegurar o calejamento do enxerto. Outro fator é a disseminação por meio do canivete de enxertia (Andrade e Ducroquet, 1992). No entanto, uma vez selecionados genótipos de elite, clones promissores ou cultivar recomendada, haverá a necessidade da multiplicação em larga escala por um processo tecnicamente e economicamente viável.

Tendo em vista estas limitações, as técnicas de cultura de tecidos vegetais se constituem em ferramentas que podem ser aplicadas com sucesso para a micropropagação clonal massal de genótipos com alto valor genético e para a domesticação desta espécie. Contudo, as técnicas disponíveis necessitam de um aprimoramento para que sejam empregadas rotineiramente.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo o estudo da morfogênese *in vitro* da *Feijoa sellowiana*, com ênfase aos fatores determinantes da embriogênese somática, visando melhorias nos fatores de indução e estabelecimento de culturas embriogênicas de genótipos selecionados.

2.1. Objetivos Específicos

2.1.1. Determinar os fatores relacionados com a indução, manutenção, multiplicação e conversão de embriões somáticos.

2.1.2. Identificar o melhor estágio de desenvolvimento dos explantes que permitam obter as maiores taxas de indução e formação de ES, bem como avaliar a viabilidade e a capacidade embriogênica após o armazenamento a frio das sementes.

2.1.3. Estabelecer ciclos repetitivos de divisão celular, manutenção, multiplicação e maturação de linhagens celulares embriogênicas.

2.1.4. Identificar genótipos com maior potencial de expressão da embriogênese somática.

2.1.5. Definir a melhor combinação entre formulação salina, níveis de 2,4-D e de aminoácidos para a indução e desenvolvimento dos embriões somáticos.

2.1.6. Avaliar o efeito de fontes e níveis de nitrogênio inorgânico no processo de indução e desenvolvimento da embriogênese somática.

2.1.7. Estabelecer pulsos de auxinas para identificar células competentes para o processo embriogenético.

2.1.8. Identificar agentes indutores da germinação e conversão de ES *in vitro* e na produção de sementes sintéticas.

2.1.9. Estudar aspectos estruturais da morfogênese *in vitro* e padrões de síntese de proteínas na embriogênese zigótica e somática.

3. REVISÃO DA LITERATURA.

3.1. Micropropagação da Goiabeira Serrana por Organogênese

Estudos sobre a organogênese *in vitro* para a micropropagação da *Feijoa sellowiana* foram desenvolvidos a partir de explantes de meristemas e folhas jovens (Bhojwani et al., 1987) e meristemas caulinares e microestacas (Dal Vesco & Guerra, 1998). Os resultados demonstraram baixas taxas de neoformação de gemas e altos índices de contaminação e oxidação, com ambas as fontes de explantes. Estes fatores indicam o grau de dificuldade e a baixa eficiência deste protocolo, embora suas aplicações práticas seriam mais imediatas por permitir a propagação de clones já selecionados. Trabalhos anteriores demonstraram a formação de calos a partir de explantes foliares inoculados em meios de cultura contendo 2-IP e ANA os quais, quando repicados para meios contendo BAP resultaram na diferenciação de brotos (Bhojwani et. al., 1987).

Em contrapartida, segmentos nodais de plântulas germinadas *in vitro* de *F. sellowiana* foram utilizados por Bhojwani et. al. (1987) para a regeneração de brotos. Neste caso, os melhores resultados foram obtidos com o meios de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) modificado, contendo BAP e caseína hidrolisada (CH). No entanto, Bassi & Cossio (1993) verificaram que os melhores resultados foram proporcionados pela formulação salina WPM (Lloyd & McCown, 1980), enriquecido com vitaminas e aminoácidos. Estes resultados foram confirmados mais tarde por Dal Vesco & Guerra (1998), que verificaram que as melhores taxas de proliferação e altura de brotos foram proporcionadas pela formulação salina WPM, isenta de fitorreguladores. Estes resultados podem estar relacionados com a composição da formulação salina WPM, recomendada para a micropropagação de espécies lenhosas e que apresenta na sua composição uma menor concentração de nitrogênio e de potássio e uma menor força iônica total.

Bhojwani et al. (1987) observaram que o enraizamento das brotações foi estimulado com a adição de 0,49 μM de AIB à formulação salina de Knop. Resultados similares foram observados com a adição de 4,9 μM de AIB e ANA à formulação salina WPM (Bassi & Cossio, 1993). Em meio de cultura $\frac{1}{4}$ MS contendo 1,2 μM de AIB e 1,5g/l de carvão ativado, Dal Vesco e Guerra (1998) observaram os melhores índices de enraizamento das brotações. Os resultados dos experimentos de enraizamento, mostraram que esta espécie tem tendência a produzir um número limitado de raízes por brotos em meios de cultura.

3.2. Embriogênese Somática

3.2.1. Histórico e Conceito

A embriogênese somática ou assexual é o processo pelo qual as células somáticas desenvolvem-se através de estádios morfológicos característicos, de seqüências similares aquelas observadas no embrião zigótico e originando uma planta completa (Williams & Maheswaram, 1986; de Jong et al., 1993; Yeung, 1995). Também pode ser definido pelo desenvolvimento de embriões a partir de uma célula simples ou de um grupo de células que não resultaram da fusão de gametas e que diferenciaram-se nos mesmos estádios ontogenéticos observados na embriogênese zigótica (Williams & Maheswaram, 1986). Os eventos da embriogênese somática também reconstituem, em contraste com a organogênese, a formação de embriões bipolares (Thorpe et al., 1991), contendo ápice caulinar e radicular (Guerra et al., 1998). Williams & Maheswaram (1986) observaram que, nas dicotiledôneas, os embriões somáticos passam por estádios de desenvolvimento típicos de pró-embrião, embrião globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar. Estes mesmos estádios ontogenéticos são observados na embriogênese zigótica de *Arabidopsis thaliana* (Lindsey & Topping, 1993; Goldberg et al., 1994; Dodeman et al., 1997).

Ao contrário do embrião zigótico, o embrião somático não apresenta conexão vascular com o tecido materno e, teoricamente, ele pode ser derivado de células de qualquer tipo de tecido. Este padrão de expressão da morfogênese, é fundamentado através da totipotencialidade da célula vegetal, postulado pelo fisiologista alemão Haberlandt no início deste século, para o qual, fornecidas as condições e estímulos adequados à uma célula nucleada, ela poderia originar uma planta completa, uma vez que células somáticas vegetais contêm todas as informações genéticas para tal (Merkle et al., 1995).

Os primeiros relatos sobre a embriogênese somática *in vitro*, foram descritos de forma independente por Steward et al. (1958) e Reinert (1958). Estes autores obtiveram a indução de calo e posteriormente suspensões celulares, a partir de floema secundário de cenoura culminando na diferenciação de embriões somáticos. A partir disto, significativos avanços foram verificados para a obtenção desta rota morfogênica. Recentemente Sharma & Thorpe (1995) relataram que a indução a embriogênese somática em angiospermas, foi descrita para 280 gêneros em 94 famílias. Estes autores também observaram que aproximadamente 60% das espécies que são induzidas à embriogênese somática, pertencem a seis famílias: Compositae, Gramineae, Liliaceae, Orchidaceae, Rosaceae e Rutaceae.

3.2.2. Padrão e Controle da Embriogênese Somática

Morfologicamente o desenvolvimento da embriogênese zigótica e da somática apresentam processos semelhantes. De Jong et al. (1993); Zimmerman (1993) e Dodeman et al. (1997) estudaram os mecanismos de controle da embriogênese zigótica e a sua correlação com os mecanismos envolvidos na indução e diferenciação das células embriogênicas *in vitro*. Lindsey & Topping (1993) consideraram padrões de similaridade da embriogênese zigótica e somática em três níveis: a) padrão de organização das células; b) padrão de acúmulo de proteínas e c) padrão de expressão gênica. É importante mencionar que a embriogênese somática *in vitro* se desenvolve fora do compartimento dos tecidos maternos, revelando que o programa genético para esta rota morfogenética encontra-se embutido na célula inicial (Zimmerman, 1993).

Ultimamente as pesquisas nesta área tem proporcionado avanços sobre os mecanismos da embriogênese somática. Este modelo proporciona um sistema experimental especial para o desenvolvimento de estudos moleculares, bioquímicos, fisiológicos e genéticos da ontogênese embrionária (Dudits et al., 1995 e Nomura & Komamine, 1995; Yeung, 1995). Segundo Zimmerman (1993), o modelo da embriogênese somática é fundamental para o entendimento da regulação da expressão dos genes necessários ao desenvolvimento em plantas superiores. O estudo da expressão gênica neste modelo está sendo explorado para obter informações moleculares sobre os eventos iniciais da embriogênese (Misra, 1995). Para isto, são utilizados geralmente, os cultivos de suspensões celulares (Szabados et al., 1993). A descrição das diferentes morfologias de células de cenoura em suspensão, permite monitorar o desenvolvimento dos ES por sistemas de vídeo acoplados à microscópios. Com este sistema pode-se determinar a capacidade individual dos tipos celulares que expressam o maior número de ES por volume de células (Toonen et al., 1994). Este sistema permite também estudar os processos iniciais no desenvolvimento dos ES a partir de células que adquiriram capacidade embriogênica (Toonen et al., 1996).

Análises de ácidos nucleicos e proteínas podem auxiliar os estudos dos eventos moleculares e celulares que ocorrem no curso da morfogênese, com especificidade para cada estágio de desenvolvimento do embrião (Misra, 1995). Além disto, estudos bioquímicos e estruturais apresentam-se como suporte para uma melhor compreensão do papel central dos hormônios ou na ativação dos sistemas de transdução (Dudits et al., 1995). Assim, através de análises histológicas, morfológicas e fisiológicas da embriogênese somática, pode-se

identificar paralelamente os mecanismos que antecedem os eventos associados ao desenvolvimento dos EZ (Alemanno et al., 1997; Dodeman et al., 1997). Desta forma, dependendo da interação entre complexos celulares e estímulos exógenos, as subseqüentes divisões celulares podem resultar no crescimento de um calo não organizado ou num crescimento polarizado que resulta na diferenciação das células embriogênicas e na formação e desenvolvimento do embrião (de Jong et al., 1993). A reprogramação da expressão gênica das células, é observada pela síntese de uma nova molécula de mRNA durante a divisão celular (Lindsey & Topping, 1993; Goldberg et al., 1994; Dudits et al., 1995). Isto pode ser visualizado após a fertilização que origina o embrião zigótico (Misra, 1995) e nas condições *in vitro* quando células ou tecidos somáticos são submetidos a tratamentos hormonais (Dudits et al., 1995), gradientes de pH ou aplicação de um campo elétrico (Smith & Krikorian, 1990), que provavelmente, modificam a polaridade das células e promovem a divisão e diferenciação celular (Dodeman et al., 1997).

Uma das principais aplicações da embriogênese somática em programas de melhoramento de plantas perenes, relaciona-se com a possibilidade da fixação do ganho genético pela captura dos componentes aditivos e não aditivos da variância genética (Guerra, et al., 1998). O primeiro é baseado no efeito independente dos alelos, enquanto que o segundo, normalmente perdido nos processos de reprodução sexuada, é baseado na interação dos alelos, dentro ou entre locus (Durzan, 1988). Este processo pode iniciar com o cruzamento controlado entre plantas que já de antemão, sabe-se que produzirão uma progênie superior (Guerra et al., 1998).

O controle de qualidade e a fidelidade clonal, ou seja, a manutenção da confiabilidade e homogeneidade genética de plantas micropropagadas, podem ser monitorados pelo uso de marcadores moleculares. Entre os mais utilizados estão os padrões de proteínas de reservas do ES e do EZ (Misra, 1995), os marcadores de DNA, tais como o RAPD e RFLP que tem sido empregados para analisar híbridos somáticos (Craig et al., 1994) e a variação somaclonal de plântulas regeneradas a partir de ES (Deverno, 1995 e Shoyama et al., 1997).

As aplicações comerciais/industriais da embriogênese somática têm demonstrado bons resultados com espécies de ciclo longo, como as florestais (Pâques et al., 1995). A reposição de um grande número de plantas de alto valor genético num espaço de tempo mais reduzido, pode ser economicamente viável, principalmente para as espécies de reflorestamento (Handley, 1995).

3.2.3. Explantes

O sucesso na iniciação e estabelecimento de culturas embriogênicas, dependem basicamente do tipo e estágio fisiológico dos explantes. Este é primeiro passo importante para a transição de células somáticas em células embriogênicas (de Jong et al., 1993). Por isto, é fundamental o reconhecimento dos explantes que tenham competência morfogenética e que estejam em estágio específico de desenvolvimento (Tulecke, 1987; Harry & Thorpe, 1991; Merkle et al., 1995). Entretanto, não está claro se esta observação reflete diferenças genéticas na habilidade das células somáticas tornarem-se embriogênicas ou se é devida à frequência de um tipo particular de células responsivas nestes tecidos (de Jong et al., 1993).

Apesar dos avanços na compreensão dos mecanismos que controlam a embriogênese somática, ainda são limitadas as fontes de explantes que contém células receptivas ou tecidos responsivos, capazes de reagirem a sinais ambientais ou químicos específicos de desenvolvimento (Yeung, 1995). Entre estes sinais, os fito-hormônios podem alterar a sensibilidade das células responsivas (Guerra et al., 1998) e induzir a formação de células competentes (Toonen et al., 1996). Tal como outros sistemas de regeneração *in vitro*, a embriogênese somática também apresenta vários fatores que afetam as respostas obtidas. Neste sentido, Guerra & Handro (1991 e 1998), observaram que a rota da embriogênese somática em *Euterpe edulis*, ocorria como resposta à interação entre estágio fisiológico do explante e o tipo e concentração de fitorreguladores presentes no meio de cultura.

Entre os explantes com maior competência morfogênica encontram-se aqueles originados de tecidos embrionários, como o tecido epidérmico de cotilédones (Guerra et al., 1998), ovários e anteras (Kiviharju et al., 1992). Estes tecidos resultam na formação de um maior número de embriões somáticos em relação aos explantes originados de tecidos maduros (Attree & Fowke, 1993), porque estes explantes apresentam células com receptores específicos e de maior sensibilidade as substâncias hormonais (Firn, 1986) ou, então, estas células podem apresentar um grande número de receptores para aquelas substâncias presentes no meio de cultura (Guerra et al., 1998). Além disto, segundo George, (1993) explantes embrionários apresentam, preferencialmente, uma embriogênese direta e requerem menores níveis de auxinas para a sua indução (Merkle et al., 1995).

A ocorrência da embriogênese somática em angiospermas foi descrita a partir de explantes de várias origens (George, 1993; Kendurkar et al., 1995; Sharma & Thorpe, 1995), região topológica (Pedroso & Pais, 1995), com maior ou menor potencial conforme o grau de diferenciação dos explantes. No entanto em gimnospermas a fonte de explantes tem sido fortemente baseada no emprego de embriões zigóticos imaturos e maduros ou região do hipocótilo e epicótilo (Thorpe et al., 1991; Harry & Thorpe, 1991), do megagametófitos (Attree

& Fowke, 1993) ou gametófito feminino (Dunstan et al., 1995). Uma relação completa das espécies de coníferas e a fonte de explantes é mencionada por Gupta & Grob (1995). Nestes casos, o modelo padrão de indução embriogenética ocorre normalmente de forma indireta, requerendo níveis mais elevados de auxinas ou um balanço adequado de auxinas e citocininas (George, 1993). Porém, a utilização de embriões zigóticos para o estabelecimento de culturas embriogênicas em coníferas, apresenta limitações porque podem regenerar plântulas geneticamente diferentes da planta matriz (Tautorus et al., 1991).

Por outro lado, explantes de plantas maduras não respondem satisfatoriamente às condições indutoras presentes nos meios de cultura, resultando em regenerações esporádicas, transitórias e limitadas a poucos genótipos, existindo uma alta recalitrância em muitas espécies de coníferas com importância econômica (Mantell et al., 1994). Portanto, o genótipo da planta doadora é um componente relevante na formação de ES em determinadas espécies (Komatsuda et al., 1991; Attree & Fowke, 1993; Merkle et al., 1995; Guerra et al., 1998).

3.2.4. Condições de Cultivo e Meios de Cultura

As condições de cultivo e a composição dos meios de cultura podem resultar em maior número de explantes responsivos ou na intensificação das respostas morfogenéticas *in vitro* (Guerra & Handro, 1991). Entre estes, podem ser considerados como principais: o balanço e tipos de nutrientes salinos associados aos diferentes tipos e concentrações de fitorreguladores (Preece, 1995); as fontes e concentrações de nitrogênio reduzido e/ou oxidado (Durzan, 1985, 1987; Kirby et al., 1987; Smith & Krikorian, 1990; Niedz, 1994; Halperin, 1995); as fontes de carbono e concentração (Attree & Fowke, 1993; Vidor, 1995; Carrier et al., 1997); vitaminas, aminoácidos e os complexos orgânicos (George, 1993); o gradiente de pH (Smith & Krikorian, 1990; de Jong et al., 1993; George, 1993); as condições ambientais externas como a luz, fotoperíodo umidade relativa (Roberts, et al., 1990) e internas, como o tamanho do frasco, a constituição física e volume do meio e as trocas atmosféricas, entre outros (Tulecke, 1987).

Desta forma, quando se pretende trabalhar com uma nova espécie, para se obter a indução da morfogênese *in vitro*, Preece (1995) recomendou testar três diferentes formulações salinas: uma com altas concentrações, uma intermediária e uma de baixa concentrações de sais. Estas três formulações podem formar um fatorial em combinação com diferentes níveis de fitorreguladores, com posterior aprimoramento com base nestes

resultados preliminares.

3.2.5. Fitorreguladores

As auxinas são os principais fitorreguladores utilizados para a indução da embriogênese somática na maioria das espécies, sendo consideradas mediadoras na transição de células somáticas para embriogênicas (Yeung, 1995; Dodeman et al., 1997) e proporcionando os melhores sistemas experimentais de indução de células embriogênicas (de Jong et al., 1993). Segundo van der Linde (1990) e Dudits et al. (1995), o mecanismo de ação das auxinas nos processos fisiológicos e regulatórios, está relacionado com a presença de receptores proteicos, localizados na membrana, no citoplasma e no núcleo. Quando este último recebe o sinal, há a ativação da RNA polimerase-II específica para a transcrição de genes envolvidos na regulação da divisão celular (van der Linde & Mennes, 1990). Deste modo, Fim (1986) descreveu que o conceito de controle hormonal tem, como base, a concentração de uma substância hormonal para a qual existem receptores específicos nos compartimentos celulares. Segundo este mesmo autor, a sensibilidade à estas substâncias é causada pela alteração no número de receptores das células responsivas e, isto, determina a magnitude de alguns processos regulatórios naquela célula.

Numerosos estudos têm revelado o papel central da aplicação exógena de auxinas, principalmente o 2,4-D, que é considerado um dos principais indutores da embriogênese somática em dicotiledôneas e monocotiledôneas (Ammirato, 1983). No entanto, os efeitos das auxinas na indução da embriogênese somática não podem ser analisados de forma absoluta. Este fitorregulador têm mostrado forte interação com o N reduzido na indução e controle da embriogênese somática *in vitro* (Smith & Krikorian, 1989 e Mercke et al., 1995). Em outros casos, tem sido demonstrado que o balanço entre auxinas e citocininas ou então, o emprego de citocininas como única fonte de fitorregulador, proporcionou esta rota morfogênica. Neste sentido, balanços de citocinina/auxinas induzem a embriogênese somática em *Picea rubens* (Harry & Thorpe, 1991), em *Juglans nigra* (Neuman et al., 1993), em outras espécies de noqueira (Preece et al., 1995), em Linho (Gomes da Cunha e Ferreira, 1996), em gerânio (Wilson et al., 1996), em mamão (Jordan & Velozo, 1996) e em algodão (Gonzalez-Benito et al., 1997). O emprego de citocinina de forma isolada induziu esta rota morfogênica em *Citrus* (Carimi et al., 1995), em *Ginkgo biloba* (Laurain et al., 1996) e também em gerânio (Wilson et al., 1996). De uma maneira geral, a indução a embriogênese somática em muitas espécies lenhosas, tem apresentado resultados, predominantemente associados ao uso do 2,4-D

(Dunstan et al., 1995).

3.2.6. Nitrogênio e Aminoácidos

Um aspecto importante do metabolismo celular primário é a incorporação do N em aminoácidos, que são os constituintes básicos para formar as proteínas, ácidos nucleicos, moléculas de clorofila, reguladores de crescimento, poliaminas e outros cofatores enzimáticos que catalisam e contribuem para o desenvolvimento celular (Durzan, 1985; Gray et al., 1987). Todo N inorgânico que é assimilado pelas plantas superiores é metabolizado e incorporado em 20 aminoácidos proteicos por aminotransferases, via ácido glutâmico e glutamina pelo ciclo da glutamina/glutamato sintetase e por transaminação do glutamato com o apropriado carbono acceptor (α -ceto-ácido) do N (Durzan, 1985 e Lea, 1993).

A metabolização das fontes de N pode ocorrer pela via de assimilação de nitrato pela enzima nitrato redutase, que regula o pool de metabólitos de nitrato e este controla a atividade desta enzima a nível de transcrição. Esta enzima é estimulada pela luz, pelo suprimento de carboidratos, reguladores de crescimento e é inibida pelo estresse ambiental (Lea, 1993). O nitrato (NO_3^-) é reduzido a nitrito (NO_2^-) no citosol, este é transportado para o cloroplasto, reduzido a amônio (NH_4^+) pela enzima nitrito redutase, sendo incorporado através do glutamato e da glutamina pela enzima glutamina sintetase (Durzan, 1985; Kirby et al., 1987; Lea, 1993). Esta enzima é ponto chave no metabolismo do nitrogênio por assimilar todo o NH_4^+ que entra na planta (Fuggi et al., 1995).

Fisiologicamente as inter-relações entre o metabolismo do nitrogênio e dos carboidratos são de grande importância nas plantas, porque a relação C/N controla inúmeros fatores fisiológicos, além da organização e desenvolvimento celular (Gray et al., 1987). Isto pode ser observado em plantas adultas, que na presença de altas concentrações de nitrogênio, atrasam a entrada na fase reprodutiva, devido a intensificação dos processos de síntese de aminoácidos, proteínas e enzimas, ácidos nucleicos, além da clorofila e vitaminas. De outra forma, podemos observar na prática de poda ou excisão de brotos, que além de todo desbalanço hormonal provocado pela quebra de dominância apical, ocorre uma redução na relação C/N que, por consequência, promove as brotações laterais e intenso desenvolvimento vegetativo (Salisbury & Ross, 1994).

Os sistemas de cultivo *in vitro* e as técnicas de biologia molecular proporcionaram inúmeras avanços no entendimento do metabolismo do nitrogênio nas plantas (Durzan, 1985). Segundo este autor, meios de cultura com altos níveis de nitrogênio em relação a sacarose, promoveram um rápido crescimento inicial na cultura de células de *Acer pseudoplatanus*,

enquanto que níveis superiores de sacarose promoveram principalmente a formação do tanino. Quando a quantidade de nitrogênio é adequada, a sacarose pode ser utilizada para a síntese de aminoácidos e proteínas, mas quando o nitrogênio é esgotado, a sacarose pode ser desviada para a síntese de tanino. Um balanço adequado entre fontes de N e sacarose promove maior crescimento e formação de ES pré-globulares em cenoura (Smith & Krikorian, 1990).

As principais fontes de nitrogênio utilizadas em meio de culturas são encontradas nas formas de NH_4^+ ou de NO_3^- . Estes íons quando são absorvidos pelas culturas promovem variações no pH do meio de cultura (Kirby et al., 1987). Desta forma, a absorção de NO_3^- resulta num aumento do pH devido a excreção de HCO_3^- pelas células ao meio externo. Na absorção de NH_4^+ as células liberam H^+ , reduzindo o pH do meio. Esta troca é promovida para manter a neutralidade internamente das células (Durzan, 1987; Kirby et al., 1987; Smith & Krikorian, 1990; Niedz, 1994; Archambault et al., 1995).

Em culturas embriogênicas de cenoura, íons de NH_4^+ podem ser a única fonte de N para a formação de ES, quando forem utilizados agentes tamponantes no meio de cultura, para manter o pH nas condições ideais (Stuart et al., 1987). Este íon é também importante para a proliferação de pró-embriões globulares (Smith & Krikorian, 1989), permitindo também uma ótima manutenção das culturas embriogênica de cenoura e favorecendo a progressão dos ES (Smith & Krikorian (1990). Os melhores resultados na diferenciação e desenvolvimento dos ES de uma gramínea híbrida (*Agropyron repens* X *Bromus inermis* cv. Nanus), foram obtidos ao eliminar-se o KNO_3 e reduzir-se pela metade a concentração de NH_4NO_3 da formulação salina MS (Gyulai et al., 1992). Portanto, para a embriogênese somática, fontes de NH_4^+ em pH neutro (6,8 a 7,0) têm mostrado resultados superiores em relação ao nitrato, exceto em pH baixo (até 5,5) (Durzan, 1987).

A utilização de nitrato como única fonte de N pelas culturas *in vitro* é dependente da intensificação da via da pentose fosfato, sendo, portanto um processo que consome muita energia (Kirby et al., 1987). Formas de N orgânico são prontamente assimiláveis e energeticamente baratas e quando adicionadas ao meio de cultura, podem melhorar as respostas ou inibir a atividade da nitrato redutase, podendo também conjugar-se com fitorreguladores, inativando-os (Durzan, 1987 e Kirby et al., 1987).

A vantagem do nitrogênio orgânico é a de ser incorporado diretamente aos aminoácidos na síntese proteica, podendo também sofrer ação enzimática de ureases, formando uréia e de alantoinases, formando ureídeos (Durzan, 1987). Nitrogênio orgânico está também associado à biossíntese de poliaminas, como a putrescina, espermidina e espermina (Adiga & Prasad, 1985; Bagni & Biondi, 1987 e Durzan, 1987). Especialmente a

putrescina promove a formação sincrônica dos embriões somáticos em cenoura e inibidores de sua síntese inibem vários estádios da embriogênese somática (Kirby et al., 1987; Minocha et al., 1995). Estas poliaminas, foram igualmente efetivas no desenvolvimento das culturas embriogênicas, quando comparados com a presença de inibidores da síntese destas poliaminas (Bagni & Biondi, 1987; Minocha et al., 1995).

A glutamina e ácido glutâmico, são precursores dos demais aminoácidos e são os mais empregados na indução da embriogênese somática ou estimulando o crescimento de tecidos diversos *in vitro* (Durzan, 1987 e Kirby et al., 1987) e na cultura de protoplastos (David et al., 1994). A adição de alanina, arginina, glutamina ou prolina aos meios de cultura, promoveram a produção de ES de alfafa (*Medicago sativum*), o aumento na síntese de proteínas de reservas nos ES e a taxa de conversão em plântulas (Lai et al., 1992). A glutamina é uma fonte de nitrogênio essencial para a morfogênese *in vitro* (George, 1993) e sua presença no meio de cultura como única fonte de N, promoveu a maturação de ES de *Picea mariana*, mas não exerceu efeitos significativos na fase de conversão dos ES, sendo que a resposta foi dependente do genótipo e da fonte de N (Khlifi & Tremblay, 1995).

É claramente benéfico o efeito da adição de uma fonte de aminoácido na iniciação e maturação de ES de coníferas (Barrett et al., 1997). A prolina pode exercer o papel de osmorregulador, de acordo com os resultados obtidos por Santos et al. (1996) em culturas embriogênicas de milho, que foram mantidas em condições de estresse salino. Neste caso, a demanda de prolina era maior quanto maior a concentrações de NaCl no meio de cultura. Os complexos de orgânicos como a caseína hidrolisada, extratos de leveduras e de malte, apresentam resultados diferentes para cada tipo de cultura e espécie (Caldas et al., 1990; George, 1993).

3.2.7. Maturação e Conversão dos Embriões Somáticos

A retirada das culturas do meio de indução e a transferência para meios desprovidos de fitorreguladores ou em concentrações reduzidas destes, permitem o desenvolvimento e maturação dos ES. Este passo estabelece as condições que estimulam a progressão das fases iniciais da embriogênese somática para o desenvolvimento do ciclo de maturação. Esta fase inicia pela divisão celular, histodiferenciação e o desenvolvimento dos ES, que ocorrem por meio da expansão celular e a deposição de reservas, tal como ocorre no desenvolvimento da embriogênese zigótica (Merkle et al., 1995). A estratégia a ser empregada consiste em interromper os ciclos repetitivos de divisão celular e fornecer estímulos fisiológicos,

bioquímicos e ambientais, para promover a diferenciação celular, desenvolvimento e conversão dos ES com alta qualidade (Guerra et al., 1998).

Embora um grande número de trabalhos têm sido publicados sobre a otimização dos meios de indução, o mesmo não ocorreu com os protocolos de maturação e conversão dos ES (Redenbaugh et al., 1986, 1988 e Merkle et al., 1995). Considerando-se que a partir de uma base celular pré-definida como linhagem celular embriogênica, o passo mais importante é a elucidação dos fatores relacionados com a maturação. A fase de maturação é descrita pela transição do ciclo de divisão, diferenciação e desenvolvimento do embrião até a conversão. Este processo ocorre como resultado da transferência das linhagens celulares de meios de cultura líquidos para meios geleificados, contendo concentrações reduzidas ou isento de auxinas. O emprego do ABA e o aumento da osmolaridade do meio de cultura são fatores que permitem esta transição, principalmente em coníferas (Tautorus & Dunstan, 1995). Nestas espécies, estes compostos bloqueiam os ciclos repetitivos de divisão celular impedindo os processos de clivagem poliembriônica (Misra, 1995; Gupta & Grob, 1995; Hristoforoglu et al., 1995; Merkle et al., 1995) e a gemação em angiospermas (Guerra et al., 1998). Em *Mangifera indica*, meios de maturação adicionados de ABA e manitol, inibiram a germinação precoce, aumentaram o comprimento dos ES e permitiram a ocorrência de embriogênese secundária de boa qualidade (Pliego-Alfaro et al., 1996a).

Stuart & Strickland (1984 a), haviam definido conversão como desenvolvimento das plântulas a partir de ES e a sobrevivência em substratos nas condições *ex vitro*. Mais tarde, Redenbaugh et al., (1988) definiu conversão quando são observados os seguintes eventos: germinação (emissão da radícula); crescimento e desenvolvimento do sistema radicular; produção de, no mínimo, duas folhas verdadeiras; conexão direta da raiz com a parte aérea e produção de uma planta verde com fenótipo normal.

Na embriogênese zigótica, o ponto chave na formação do embrião é o acúmulo de substâncias de reservas e a correlação com os níveis de ABA acumulados. Existe uma correlação temporária entre altos níveis de ABA com o início do crescimento/ desenvolvimento e no programa de maturação do embrião (Rock & Quatrano, 1995). Na fase final da embriogênese, o ABA regula a expressão da síntese de proteínas de reservas (Lai et al., 1992; Gupta & Grob, 1995; Merkle et al., 1995; Misra, 1995; Rock & Quatrano, 1995; Alemanno et al., 1997). No entanto, os níveis deste hormônio declinam por ocasião da maturação e a desidratação dos embriões (Walton & Li, 1995). A síntese de substâncias de reserva está associada com a germinação e com a obtenção de uma planta completa com alto vigor (Rock & Quatrano, 1995).

Desta forma, a recapitulação da ontogênese da embriogênese zigótica pode permitir

uma melhor manipulação dos sistemas experimentais da embriogênese somática. Proteínas e o ABA podem se constituir em importantes marcadores bioquímicos, moleculares e fisiológicos para a obtenção de ES de alta qualidade (Merkle et al., 1995). As proteínas têm uma grande potencialidade como marcadores, porque elas indicam, em particular, um estágio específico de desenvolvimento do embrião (Misra, 1995).

Os hormônios de maior importância encontrados nas semente são as citocininas, auxinas, giberelinas e o ácido abscísico e seus níveis variam conforme o estágio de desenvolvimento do embrião (Rock & Quatrano, 1995). No entanto, o modelo embriogênese somática vem contribuindo muito para o esclarecimento dos eventos associados às funções destes hormônios. Entre estes, o ABA é o mais estudado, porque ele é um componente essencial na fase final da embriogênese (Rock & Quatrano, 1995). Nos estudos da embriogênese somática, a adição de ABA aos meios de cultura promoveu a síntese de proteínas de reservas no ES (Roberts et al., 1990; Roberts, 1991; Thompson e von Aderkas, 1992; Attree & Fowke, 1993; Gupta & Grob, 1995; Merkle et al., 1995) e a síntese de lipídios, amido e proteínas LEA - late embryogenesis abundant (Attree & Fowke, 1993, Merkle et al., 1995).

Particularmente as proteínas LEA são sintetizadas para aumentar a resistência da membrana durante o processo de desidratação do embrião (Rock & Quatrano, 1995). No entanto, Pliego-Alfaro et al. (1996 a) verificaram que na embriogênese somática de manga, o ABA não foi eficiente em aumentar a tolerância à desidratação dos ES. Neste sentido, Lai et al. (1992) observaram que altos níveis de ABA inibem a deposição de substâncias de reservas em ES de alfafa, mas, quando a glutamina e baixos níveis de ABA foram adicionados ao meio de cultura, houve um aumento significativo no peso seco e síntese de proteínas nos ES. Pliego-Alfaro et al. (1996 b), verificaram que, em manga, altos níveis de ABA, manitol e baixas temperaturas, inibiram o desenvolvimento da embriogênese zigótica.

Os níveis de ABA geralmente adicionados ao meio de cultura na fase de maturação variam para cada espécie, tempo de exposição e composição do meio de cultura. O ABA associado a um agente osmótico, inibe a germinação precoce e pode auxiliar na maturação dos ES em coníferas (Misra, 1995). Porém, uma combinação de osmorregulador com a estratificação à frio, como é requerido pelos EZ, pode otimizar a conversão de ES das espécies lenhosas de uma maneira geral (Merkle, 1995).

3.2.8. Sementes Sintéticas

No início da década de 70 o Prof. Toshio Murashige já havia formulado o conceito de

semente sintética (SS), mas somente apresentou esta idéia em 1977, num Simpósio sobre Cultura de Tecidos Vegetais realizado na Bélgica (Murashige, 1977). Nesta década, haviam vários trabalhos de pesquisa sobre embriogênese somática em espécies cultivadas, mas não tinham relatos de experimentos com semente sintética (Redenbaugh et al., 1988). Segundo estes autores, foi sugerido utilizar o sistema de peletização que já era empregado para as espécies florestais, entretanto, nenhum trabalho sobre esta técnica foi publicado. O uso de polioxietileno foi sugerido por Kitto e Janick (1985) e do hidrogel hidratado por Randenbaugh et al. (1986).

As primeiras pesquisas com hidrogéis, foram desenvolvidas por Redenbaugh et al. (1984, 1986) para encapsular ES de alfafa e aipo. Estes autores testaram vários tipos e concentrações de agentes complexadores para a produção da cápsula e testar a sobrevivência dos ES. Com estes estudos, estes autores identificaram que os hidrogéis formados pelo alginato de sódio ou de potássio e complexados em cloreto de cálcio, podiam ser empregados para a confecção das cápsulas na produção de sementes sintéticas. No ano de 1986, Gray organizou o primeiro simpósio sobre sementes sintéticas, em Davis na Califórnia, para discutir esta tecnologia, desde o controle da maturação dos embriões zigóticos e somáticos, produções de ES em biorreatores, encapsulamento e técnicas de desidratação dos ES (Gray, 1987).

A semente sintética ou artificial é uma nova semente análoga à semente verdadeira ou botânica, que consiste de um embrião somático envolto por uma ou mais camadas de compostos artificiais formando uma cápsula. Esta cápsula serve de proteção ao embrião somático, produzido em larga escala contra danos mecânicos durante a armazenagem, transporte e semeadura (Gray & Purohit, 1991 e Onishi et al., 1994). O alginato de sódio é considerado hoje, o melhor composto para a confecção das cápsulas pelas suas propriedades de não ser tóxico, ser de baixo custo e apresentar facilidade de manuseio (Redenbaugh et al., 1987, 1988; Redenbaugh, 1990; Onishi et al., 1994; Muralidharam & Mascarenhas, 1995).

O custo de uma semente sintética, segundo Redenbaugh et al. (1987) é estimado em 0,026 centavos de dólar. Estes valores são compatíveis com os custos de uma semente verdadeira híbrida, principalmente quando foram utilizados sistemas de biorreatores (Stuart et al., 1987). Entretanto, quando foram encapsulados ES de alfafa hidratados, técnica esta que envolve muita manipulação, o custo médio para cada planta transplantada em casa de vegetação pode ser de 0,033 centavos de dólares (Gray & Purohit, 1991). Considerando que este processo pode produzir 50-100 embriões para cada ml de suspensão sedimentado, para cada litro de meio de cultura seria possível obter 50 a 100.000 ES (Guerra et al., 1998).

O alginato de sódio na presença de um cátion bi ou trivalente, complexa-se e forma

alginate de cálcio. Os íons cálcio formam ligações iônicas com os grupos do ácido carboxílico e o ácido gulurônico da molécula do alginato. O mais importante desta técnica é que ela não requer a diluição do gel em altas temperaturas, havendo a complexação imediata do alginato de sódio quando em contato com o CaCl_2 (Redenbaugh et al., 1988). O tamanho da cápsula pode ser controlado pela viscosidade do gel e pelo diâmetro do bocal utilizado para formar a cápsula.

A cápsula pode ser constituída por um componente inerte ou pode ser biologicamente ativa, pela incorporação de compostos para formar um endosperma artificial, especialmente para espécies albuminosas (Onishi et al., 1994). Estas camadas que envolvem o embrião, podem conter ou liberar um complexo nutritivo e/ou de proteção, para assegurar a viabilidade dos ES e favorecer a conversão (Redenbaugh et al., 1987). Neste sentido, é unânime entre os autores buscar reconstituir os componentes das estruturas de reservas do endosperma verdadeiro. Principalmente, são adicionados uma fonte de carbono, sais minerais e compostos orgânicos, como os aminoácidos essenciais e fitorreguladores, que promovem a conversão, crescimento e desenvolvimento das plântulas (Gray & Purohit, 1991; Attree & Fowke, 1993; Merkle et al., 1995). Além disto, este endosperma artificial pode ser enriquecido com alguns agentes específicos da rizosfera, como as micorrizas e rizóbios (Schultheis et al., 1990; Guerra et al., 1998) ou também, com produtos para o controle de agentes patogênicos, tais como os pesticidas, antibióticos e outros (Attree & Fowke, 1993).

Uma camada externa, também chamada de camada hidrofóbica pode também ser necessária para a reduzir a desidratação da cápsula (Redenbaugh et al., 1987 e 1988). A utilização da forma hidratada ou desidratada dependerá da espécie ou estágio de desenvolvimento dos ES (Attree & Fowke, 1993 e Merkle et al., 1995). No entanto, quando foram encapsulados ES de alfafa hidratados, os custos finais foram maiores (Gray & Purohit, 1991). Além disto, as cápsulas de alginato de cálcio são muito pegajosas e secam rapidamente quando expostas ao ar. Este problema causa dificuldades com o manuseio e no plantio mecânico. Por isto, (Redenbaugh, et al., 1988) recomendaram a utilização de uma sobrecamada com algum polímero hidrofóbico para proteger a semente sintética contra danos mecânicos e impedir a desidratação das cápsulas.

A razão para desenvolver a semente sintética, é a garantia de um ganho genético, que resulta, no final, em um melhor stand e uma produção desejável. Esta tecnologia assume um papel importante, por permitir a transição da cultura *in vitro* diretamente para o plantio em casa de vegetação ou a campo (Carrier et al., 1997), da mesma maneira que a tecnologia da propagação vegetativa e produção de sementes de variedades híbridas. A tecnologia da semente sintética é uma alternativa aos altos custos da propagação vegetativa e é

fundamentada na possibilidade da utilização de materiais e ambiente de laboratório para a produção de ES, sem limitações de época do ano (Redenbaugh et al., 1988; Gray & Purohit, 1991; Guerra et al., 1998).

Resumidamente, a produção de semente sintética pode ser avaliada positivamente da seguinte forma: a) apresentar baixo custo em produções de grandes volumes (biorreatores) numa pequena área e num curto espaço de tempo; b) manutenção da fidelidade clonal; c) armazenamento; d) semeadura direta a campo, sem aclimatização; e) baixo custo por planta, porque podem ser eliminadas as etapas em estruturas de sementeira e viveiros (Redenbaugh et al., 1988; Gray, 1995; Guerra et al., 1998).

Os problemas fundamentais encontrados para a produção de sementes sintéticas relacionam-se com a produção de ES de alta qualidade. Estes, devem apresentar o vigor e valor econômico semelhantes ao embrião zigótico (Redenbaugh et al., 1988 e Merkle et al., 1995). Esta tecnologia é, também, dependente do desenvolvimento de métodos de obtenção de ES em "scale up", em forma sincrônica, com uma rotina de maturação dos ES de alta qualidade e, principalmente, em sistemas automatizados (Debergh, 1995 e Handley, 1995). Para a aplicação comercial, há a necessidade de se ter uma semente sintética que possibilite a germinação e o desenvolvimento de plantas comparáveis àquelas obtidas a partir de sementes verdadeiras.

3.2.9. Embriogênese Somática na Goiabeira Serrana

A rota de embriogênese somática (ES) da *Feijoa sellowiana* foi obtida por Cruz et al. (1990) a partir de calos originados na região cotiledonar de embrião zigótico, cultivados em meio basal MS suplementado com 2,4-D. Por meio da alteração nos níveis de sacarose no meio de cultura foi possível a indução de ES de alta frequência (Canhoto & Cruz, 1994). Posteriormente, Canhoto & Cruz (1996 a) descreveram melhorias no protocolo de ES nesta espécie. Também, Canhoto & Cruz (1996 b) descreveram as alterações anatômicas e histológicas durante o processo de ES nesta espécie. No ano seguinte Guerra et al. (1997) observaram uma estreita relação entre as respostas morfogenéticas *in vitro* e o genótipo e a composição do meio de cultura. Estes autores verificaram que o acesso 101, do banco de germoplasma da EPAGRI, nativo de Santa Catarina, quando cultivado em meio de cultura, contendo a formulação salina ½ LP (von Arnold & Eriksson, 1977), resultou em maiores taxas de indução de embriogênese somática em comparação à formulação salina MS e o acesso 452, proveniente da Califórnia - EUA.

Além da *F. sellowiana*, em outros gêneros pertencentes a família Mirtaceae, também

foi obtida a rota da embriogênese somática. Em *Eugenia jambos*, *E. macaenses* e *Myrciaria cauliflora*, Litz (1984 a, b) obteve a indução da embriogênese somática. Nestes dois gêneros, a formação de embriões somáticos foi favorecida pelo emprego de explantes juvenis. Muralidharan et al. (1989) obtiveram a regeneração de plântulas a partir de ES em *E. citriodora*. Segundo estes autores, culturas embriogênicas originadas diretamente, sem a formação de calo a partir de EZ maduros, resultaram na formação de ES de alta frequência. Muralidharan & Mascarenhas (1995) descreveram todos os fatores determinantes da indução a embriogênese somática em *Eucalyptus*, estabelecimento de culturas embriogênicas, suspensões celulares, maturação e conversão de ES com a produção de semente sintética.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Origem dos Explantes

Para iniciação e estabelecimento das culturas in vitro, foram utilizados embriões zigóticos (EZ) extraídos de frutos imaturos em diferentes estádios de maturação (dias após a antese) e frutos fisiologicamente maduros (ponto de colheita), coletados de plantas matrizes de acessos da espécie *Feijoa sellowiana* Berg, mantidas nas coleções de germoplasma da EPAGRI, no CTA de São Joaquim (SC) e Estação Experimental de Videira (SC). Foram utilizadas, também, outras fontes de explantes, excisadas de botões florais, como pétalas, estames, estigmas e ovários. O acesso é aqui definido como uma amostra de germoplasma representativa de um ou de vários indivíduos de uma população.

4.2. Condições de Cultivo

Todas as etapas laboratoriais foram desenvolvidas no Laboratório de Fisiologia e desenvolvimento genético Vegetais (LFDGV) do Departamento de Fitotecnia (FIT) do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis-SC.

Para os ensaios de indução à embriogênese somática, EZ foram inoculados em tubos de ensaio (22 x 150 mm) contendo 10 ml de meio de cultura. As repicagens para o estabelecimento e, principalmente, para a maturação das linhagens celulares, foram feitas para placas de Petri, contendo 25 ml de meio de cultura por placa. Para a multiplicação das culturas em suspensões celulares foram utilizados frascos de Steward, com capacidade para 1.000 ml. Estes frascos são balões volumétricos com protuberâncias (tipo "nipple-flask") e preenchidos com 100 ml de meio de cultura. Estas culturas foram mantidas em sala de crescimento na ausência de luz, até a etapa final de maturação das linhagens celulares, enquanto que, para os ensaios de conversão dos embriões somáticos, as culturas foram transferidas para placas de petri e em salas de crescimento, com temperatura de $27 \pm 2^\circ \text{C}$, intensidade luminosa média de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz.

4.3. Metodologia

4.3.1. Indução à Embriogênese Somática

A metodologia desenvolvida nos ensaios para a indução a embriogênese somática,

constou na sequência de: seleção dos explantes e tratamento de assepsia segundo a metodologia desenvolvida por Guerra, et al. (1997). Com o auxílio de um estereomicroscópio foram realizadas as extrações dos EZ. Com o objetivo de proporcionar um aprimoramento no protocolo, bem como definir algumas fatores de estabelecimento do ciclo repetitivo (ciclo A) representado na Fig. 1, p. 63, foram instalados diferentes ensaios.

Ao meio basal foram adicionados, sacarose (3,0%); vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951) e para os meios geleificados foram adicionados agar-agar (0,65%) ou phytigel (2%). O pH do meio de cultura, foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem do meio de cultura.

4.3.1.1. Seleção de Acessos

Utilizou-se como fonte de explantes, embriões zigóticos (EZ) extraídos de frutos maduros dos acessos: 50-4, 53B-7, 101, 529 e 152-12x458, provenientes da coleção de germoplasma da EPAGRI. Para a indução da embriogênese somática adicionou-se ao meio de cultura basal, composto da formulação salina LP modificado (von Arnold & Eriksson, 1981), LPm (Tabela 1, p.81), 20 μ M de 2,4-D e 4 mM de Glutamina.

O delineamento estatístico destes ensaios foi completamente casualizado, com 5 acessos e 4 repetições. As unidades experimentais foram constituídas de 10 embriões zigóticos, arranjadas de uma forma completamente casualizada. Os dados de percentagem de explantes com ES (% de ES) e número de ES por explante (número de ES) foram coletados no período de cinco, dez e quinze semanas após a inoculação. Quando necessário os dados foram transformados e posteriormente submetidos à análise de variância e ao teste SNK (5%) de separação de médias, de acordo com o item 4.3.8.

4.3.1.2. Definição das Formulações Salinas

A fonte de explantes utilizada neste ensaio, foi EZ extraídos de frutos imaturos coletados com 75, 90, 105 e 120 dias após a antese, provenientes de plantas matrizes do acesso 101, mantidas no banco de germoplasma da EPAGRI - Estação Experimental de Videria (SC). O acesso 101 foi escolhido pela maior disponibilidade de frutos e sementes no banco de germoplasma. Estes frutos foram mantidos sob refrigeração e transferidos para o laboratório, para a extração dos EZ. Com o objetivo de definir o meio de cultura basal padrão a ser utilizado na fase de indução da embriogênese somática, foram testadas as formulações

salinas MS (Murashige & Skoog, 1962), LPm (von Arnold & Eriksson, 1981) e WPM (LLoyd & McCown, 1980), conforme se observa na Tabela 1. Com base nas observações preliminares de Guerra et al. (1997) e nas considerações sobre o balanceamento dos constituintes salinos feitas por Preece (1995). Ao meio de cultura basal foram adicionados dois níveis de 2,4-D (10 e 20 μM). Testou-se também dois níveis de Gln (0 e 4 mM), para verificar o potencial de assimilação desta fonte de N orgânico pelos explantes, bem como favorecer os processos de indução e de ontogênese embrionária.

O delineamento de tratamento foi um fatorial de $3 \times 2 \times 2$, onde foram testados as combinações de: três formulações salinas; duas concentrações de 2,4-D e duas concentrações de Gln, totalizando 12 combinações. Cada unidade experimental foi constituída de 10 embriões zigóticos, as quais foram arranjadas de uma forma de blocos completamente casualizado, por data de coleta dos frutos e repetidos quatro vezes. Os valores de % de ES e número de ES por explantes, foram coletados no período de cinco, dez, quinze e vinte semanas após a inoculação. Estes dados, quando apresentaram heterogeneidade das variâncias foram transformados e posteriormente submetidos à análise da variância e ao teste SNK (5%) de separação de médias, de acordo com o item 4.3.8. Dados resultantes do fator concentração de Gln foram submetidos à análise de regressão, para avaliar as taxas de indução a embriogênese somática e a viabilidade dos ES, em função do tempo de avaliação.

4.3.1.3. Fontes de Nitrogênio Inorgânico e Orgânico

a) Influência do NH_4^+ , NO_3^- e Glutamina

Neste ensaio foram utilizados os mesmos explantes, local e período de coleta dos frutos, descritos no item 4.3.1.2. Tendo a formulação salina LPm (von Arnold & Eriksson, 1981) como meio basal, definido no item 4.3.1.2 ou de acordo com os trabalhos de Guerra et al. (1997), foram testadas diferentes proporções dos íons $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ (0/0; 0/49; 15/34; 34/15; 49/0 mM) combinadas com Gln (0 e 4 mM). Ao meio de cultura basal foi adicionado o 2,4-D (20 μM) e para manter a força iônica do meio de cultura foram utilizados outras fontes e íons, tais como NH_4Cl , KCl e NaNO_3 , em ajuste aos componentes alterados da formulação básica.

O desenho experimental utilizado foi um fatorial de 5×2 , onde foram testados, cinco relações de $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ e dois níveis de Gln, totalizando 10 tratamentos. Cada unidade experimental foi constituída de 10 explantes, arranjadas em forma de blocos completamente casualizados, com quatro repetições. Os dados de % de ES e número de ES por explantes, coletados no período de cinco, dez, quinze e vinte semanas após a inoculação e, foram analisados de acordo com o item 4.3.8. Dados resultantes do fator concentração de Gln foram

submetidos à análise de regressão, para avaliar a capacidade embriogênica em percentagens de ES e a viabilidade dos ES, em função do tempo de permanência ao meio de cultura (semanas após a inoculação).

b) Fontes e Níveis de Aminoácidos

A fonte de explantes utilizada neste ensaio foram EZ extraídos de frutos maduros coletados de plantas matrizes do acesso 101, mantidas no banco de germoplasma da EPAGRI - CTA de São Joaquim (SC). As sementes deste acesso foram armazenadas por um período de 24 meses em geladeira a 4° C. Ao meio de cultura basal LPm (von Arnold & Eriksson, 1981), adicionou-se de 2,4-D (10 µM), pré-definido nos ensaios citados no item 4.3.1.2, bem como asparagina (4 mM), arginina (4 mM) e cinco níveis de glutamina (0; 2; 4; 6 e 8 mM).

O delineamento estatístico foi completamente casualizado, com total de sete tratamentos e quatro repetições. As unidades experimentais foram constituídas de 10 embriões zigóticos cada uma arranjadas de uma forma completamente casualizada. Dados dos parâmetros percentagem de explantes com ES e número de ES por explantes foram coletados nos períodos de cinco e dez semanas após a inoculação e dados transformados foram e submetidos à análise da variância e ao teste SNK (5%) de separação de médias. Dados resultantes dos ensaios com níveis de Gln foram submetidos à análise de regressão.

4.3.1.4. Influência de Pulsos de 2,4-D

Sementes de plantas matrizes do acesso 101, mantidas no banco de germoplasma da EPAGRI - CTA de São Joaquim (SC), permaneceram armazenadas no laboratório por um período de 12 meses em geladeira a 4° C. EZ foram submetidos a pulsos de 2,4-D (20 µM), em diferentes tempos de exposição (1; 2; 4; 8 e 16 semanas). Este ensaio foi implementado com o objetivo de verificar a competência embriogênica, a partir de células da epiderme da região cotiledonar dos embriões zigóticos, segundo os postulados de de Jong et al. (1993) e Toonen et al. (1996). O meio de cultura utilizado foi baseado na formulação salina LPm (von Arnold & Eriksson, 1981), pré-definido no item 4.3.1.2 e suplementado com 2,4-D (20 µM) e Gln (4 mM). Ao final do período de exposição, as culturas foram repicadas para meios de cultura isentos de fitorreguladores.

O delineamento estatístico foi completamente casualizado, com cinco tratamentos, onde testou-se 5 diferentes tempos de exposição. Cada unidade experimental foi constituída de 10 embriões zigóticos em quatro repetições. Os dados de % de ES e número de ES por explantes foram coletados no período de cinco, dez, quinze e vinte semanas após a inoculação. Quando

necessário os dados foram transformados e, em seguida foram submetidos à análise da variância e ao teste SNK (5%) de separação de médias. Os dados resultantes de cada tempo (semanas) de exposição, foram submetidos à análise de regressão.

4.3.1.5. Estádio de Desenvolvimento dos Embriões Zigóticos

Para avaliar o efeito dos diferentes estádios de desenvolvimento dos EZ na indução e expressão da ES, foram coletados EZ em diferentes estádios de maturação dos frutos (dias após a antese), do acesso 101. Foram coletados frutos aos 75; 90; 105; 120 e 135 dias após a antese. A metodologia utilizada foi a mesma descrita no item 4.3.1. e no subitem 4.3.1.2. Além disto, foram avaliados dados coletados de alguns ensaios de indução a embriogênese somática, descritos nos itens anteriores. Utilizou-se o meio de cultura LPm adicionado de 2,4-D (20 μ M) e Gln (4 mM).

O delineamento de tratamento foi completamente casualizado com 5 tratamentos. Cada unidade experimental foi constituída de 20 embriões zigóticos, em forma de blocos completos casualizados com quatro repetições. Os dados de % de ES e número de ES por explantes coletados no período de cinco e dez semanas e de quinze após a inoculação, período de avaliação em ambos os ensaios, quando necessários foram transformados e submetidos à análise da variância e ao teste SNK (5%) de separação de médias.

4.3.1.6. Tempo de Armazenamento dos Embriões Zigóticos

Neste ensaio objetivou-se avaliar a capacidade de expressão embriogênica e a viabilidade dos EZ armazenados em baixas temperaturas. Para isto, foram reunidos dados coletados dos ensaios de indução a embriogênese somática (descritos nos itens 3.3.1.). A fonte de explantes utilizada neste ensaio, foram EZ extraídos de frutos fisiologicamente maduros, provenientes de plantas matrizes do acesso 101, mantidas no banco de germoplasma da EPAGRI - Estação Experimental de Videira (SC) e CTA de São Joaquim (SC). As sementes foram mantidas por um período de 0; 4; 8; 12; 16 e 20 meses em geladeiras sob refrigeração a 4° C. A metodologia empregada para a extração dos EZ foi a mesma descrita no item 3.3.1. e o meio de cultura utilizado constou da formulação salina LPm (von Arnold & Eriksson, 1981), adicionada de 2,4-D (20 μ M) e Gln (4 mM).

O delineamento de tratamento foi completamente casualizado com seis tratamentos,

onde se avaliou seis diferentes períodos de armazenamento. Cada unidade experimental foi constituída de 20 embriões zigóticos, arranjadas em forma de blocos completos casualizados, com quatro repetições. Os dados de % de ES e número de ES por explante, foram coletados no período de dez semanas após a inoculação, considerado como o mais adequado para esta fonte de explante. Estes dados, quando necessário, foram transformados e submetidos à análise da variância, ao teste SNK (5%) de separação de médias. Os dados quantitativos dos dois parâmetros em função do tempo de armazenamento foram também submetidos à análise de regressão.

4.3.2. Linhagens Celulares Embriogênicas

4.3.2.1. Indução e Estabilização

Linhagens celulares embriogênicas "LCE" ou massas pro-embriogênicas "MPEs" (Halperin, 1966 e Zimmerman, 1993), ou simplesmente células embriogênicas "CE" (de Jong et al., 1993 e Merkle et al., 1995), induzidas a partir de EZ do acesso 101, foram identificadas e isoladas a partir dos meios de cultura de indução (descritas nos itens 4.3.1). Estas culturas celulares foram utilizadas como fontes de explantes para estabelecer, multiplicar e manter em ciclos repetitivos de divisão celular, de acordo com a Fig. 1A, p.63.

Culturas celulares foram selecionadas e subcultivadas por sucessivas repicagens para promover o estabelecimento das linhagens celulares. Estes processos inicialmente foram realizados em tubos de ensaios, seguindo-se do plaqueamento das culturas. contendo 10 e 25 ml de meio de cultura, respectivamente. O meio de cultura basal empregado foi a formulação salina LPm e uma combinação dos fitorreguladores 2,4-D (0; 0,5; 1; 2,0; 3,0 e 5,0 μM), 2-iP (0 e 1,0 μM), Kin (0 e 0,5 μM). Como suplementação adicionou-se Gln (4 mM), sacarose (3%), vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951). O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem do meio de cultura. Suspensões celulares foram estabelecidas a partir de linhagens celulares embriogênicas, em meio de cultura basal líquido LPm (von Arnold & Eriksson, 1981), adicionado 2,4-D (2 μM), 2-iP (1 μM) e Gln (4 mM).

4.3.2.2. Multiplicação

Para a multiplicação as suspensões celulares foram inoculadas em frascos de Steward

e para o estabelecimento das curvas de crescimento, foram utilizados os mesmos frascos adaptados com tubo de centrífuga graduado. Estas culturas foram mantidas em agitador rotatório orbital a 1 rpm (aparato de Steward) e mantidas em sala de crescimento com temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, na ausência de luz. Para o estabelecimento da dinâmica de crescimento celular empregou-se a técnica do volume sedimentado, efetuando-se leituras de três em três dias, com tempo de sedimentação de uma hora. Estas cultura foram mantidas em meio de cultura basal LPm suplementado com 2,4-D (0; 1,0 e 2,0 μM) e 2iP (0 e 1,0 μM).

4.3.2.3. Manutenção

Para permitir a manutenção das características e do potencial embriogênico das LCE, as mesmas foram mantidas em meio de cultura geleificado. Na sequência a multiplicação em culturas líquidas, as células foram separadas pelo processo de filtração. Malhas com diferentes tamanhos (105, 250 e 500 μm), foram empregados para estabelecer diferentes grupos celulares e avaliar o seu potencial de regeneração. Cinco colônias de aproximadamente 250 mg foram inoculadas em sistemas de plaqueamento. Para isto, utilizou-se como meio de cultura a formulação basal LPm livre de fitorreguladores e/ou adicionada de 2,4-D (1 e 2 μM) combinado com 2iP (1 μM) e suplementada com Gln (4 mM), sacarose (30g/l) e geleificado com phytigel (2,5 g/l).

4.3.2.4. Maturação de Linhagens Celulares

Linhagens celulares mantidas em plaqueamento e em suspensões foram submetidas à diferentes tratamentos de indução à maturação. Foram fornecidos estímulos fisiológicos (agentes osmóticos), químicos (fitorreguladores) e ambientais (presença e ausência de luz) para possibilitar a diferenciação e completar o ciclo de maturação (Fig. 1B). Para isto, foram adicionados ao meio de cultura basal LPm, manitol (50 mM), PEG 8000 (10 mM), ABA (10 μM) e 2-iP (5 μM). Este meio de cultura foi suplementado com Gln (4 mM), sacarose (3%) e vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951). O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem do meio de cultura. Foram realizados sucessivas repicagens em meio de cultura geleificado, conforme o esquema proposto na Fig. 12, p.73. Parte das culturas foram mantidas na ausência e parte na presença de luz. Para proporcionar o completo desenvolvimento dos embriões somáticos e a conversão em plântulas, as culturas foram removidas para estantes na presença de luz.

4.3.3. Caracterização Histoquímica

Através de análises histoquímicas foram identificadas e caracterizadas culturas embriogênicas e os tipos celulares nelas presentes. Empregou-se a técnica da dupla coloração com Azul de Evans (0,1%) e Carmin Acético (2%) (Durzan, 1988), para o reconhecimento de células embriogênicas e a coloração com Lugol e Sudam III (Johansen, 1940) para identificação de grupos celulares com a presença de grãos de amido e de corpos lipídicos, respectivamente.

4.3.4. Conversão de Embriões Somáticos

Experimento 1 - Utilizou-se embriões somáticos no estágio de torpedo a cotiledonar com o objetivo de estimular a conversão e a regeneração de plantas completas. Para promover a conversão foram adicionados ao meio de cultura basal LPM o BAP (0 e 0,5 μM), Kin (0,5 μM), 2-iP (0,5 μM), em combinação com GA₃ (0 e 0,1 μM) e suplementados com Gln (4 mM), sacarose (30 g/l), vitaminas de Morel e phytigel (2,5 g/l).

O delineamento de tratamento foi um fatorial de 3 x 2, com seis combinações de fitorreguladores (três diferentes citocininas e duas concentrações de GA₃). As unidades experimentais foram constituídas de 50 embriões somáticos, arranjadas de uma forma de blocos completos casualizados com três repetições. Dados da percentagem de conversão em plântulas completas, plântulas com cotilédone aberto, com emissão da radícula e sem resposta, foram coletados em quinze dias após a inoculação e submetidos à análise de variância e ao teste SNK (5%) de separação de médias.

Experimento 2 - Este ensaio foi realizado com o objetivo de melhorar a conversão dos ES em plântulas completas, a partir do melhor tratamento ou combinação de fitorreguladores verificados no experimento 1. Ao meio de cultura basal LPM, foram adicionados o BAP (0,25; 0,5 e 1,0 μM) e GA₃, (0,1 e 0,5 μM). A fonte de material vegetal foi a mesma descrita no primeiro ensaio.

O delineamento de tratamento foi um fatorial de 3 x 2, com seis combinações (três concentrações de BAP e duas concentrações de GA₃). As unidades experimentais foram constituídas de 50 embriões somáticos, arranjadas de uma forma de blocos completos casualizados com três repetições. Dados da percentagem de conversão em plântulas completas, plântulas com cotilédone aberto, com emissão da radícula e sem resposta, foram coletados em quinze dias após a inoculação, submetidos à análise de variância e ao teste SNK

(5%) de separação de médias.

4.3.5. Produção de Sementes Sintéticas em Cápsulas de Hidrogel

4.3.5.1. Material Vegetal

Embriões somáticos (ES) pré-germinados em meio de cultura LPm suplementados com BAP (1 μM) e GA₃ (0,5 μM), foram a fonte de materiais para estes ensaios.

4.3.5.2. Metodologia

Após isolados e mergulhados em solução de alginato de sódio (1%), os ES foram capturados pelo sistema de gotas e em seguida complexados em CaCl₂ (100 mM). Com o objetivo de melhorar e possibilitar a conversão em plântulas viáveis foram elaborados endospermas artificiais. Para isto, adicionou-se ao alginato de sódio (1%), diferentes soluções nutritivas, como a formulação salina de LPm; os fitorreguladores GA₃ (0,05 μM) e Kin (0,5 μM); CH (500 mg/l) e as vitaminas de Morel (2 ml/l). Após a confecção as cápsulas foram enxaguadas em água destilada, para retirar o excesso de Ca⁺⁺; seguido do armazenamento em geladeira a 4° C, por duas semanas.

Antes da transferência para a germinação, as cápsulas foram imersas em solução de KNO₃ (0 e 200 mM) por 30 minutos. Este composto foi empregado para facilitar a abertura das cápsulas. Este processo promove a substituição dos Ca⁺⁺ pelo K⁺, favorecendo desta forma que a cápsula seja descomplexada e facilita a germinação das plântulas (Onishi et al., 1994).

O delineamento de tratamento foi um fatorial 4x2, com oito combinações (quatro soluções nutritivas e dois compostos para abertura da cápsula). As unidades experimentais foram constituídas de dez embriões somáticos, arranjadas de uma forma de blocos completos casualizados com cinco repetições. Dados da percentagem de conversão em plântulas completas, com a emissão da radícula e cotilédones abertos, ES sem resposta e cápsulas contaminadas, foram coletados aos quinze dias após a transferência para sala de incubação. Quando necessários os dados foram transformados e submetidos à análise de variância e ao teste SNK (5%) de separação de médias.

4.3.6. Aclimatização das Plântulas

Plântulas completas originadas da maturação de embriões ou da germinação das

sementes sintéticas, foram acondicionadas em bandejas de isopor e dispostas em câmaras de fitotron. O substrato utilizado foi uma composição de areia, casca de arroz carbonizada, e terra roxa estruturada (1:1:1 v/v). Para a suplementação nutricional foram realizadas adubações foliares utilizando uma composição de ¼ LPM. Após 30 dias, estas plantas foram transferidas para túnel de nebulização com irrigação intermitente sob sombrite.

4.3.7. Análises Estruturais

Amostras representativas da região cotiledonar dos EZ do acesso 101, previamente induzidos em meio de cultura LPM, com diferentes períodos de indução (12; 14; 16; 18; 20; 24; 28; 30; 34; 40 e 70 dias), ao 2,4-D (20 µM), foram selecionadas e fixadas em glutaraldialdeído (2,5%) e em tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8). Posteriormente, foram desidratadas em série ascendente etílica, xilol e incluídas em parafina (SASS, 1951). Secções seriadas de 8-12 µm de espessura foram obtidas em micrótomo, em seguida foram distendidas e coradas com safranina e "fast-green". Registrou-se por fotomicrografia os aspectos estruturais mais relevantes.

4.3.8. Análise Estatística

A análise dos experimentos e as interpretações dos dados de percentagem de explantes com embriões somáticos (% de ES) e número de embriões somáticos por explante (número de ES), coletados em diferentes períodos após a inoculação foram avaliados estatisticamente. Anteriormente a estas análises, os dados foram submetidos ao teste de F-máximo para verificar a heterogeneidades das variâncias (S^2). Desta forma, dados de % de ES e de número de ES, que apresentavam valores significativos para o F-máximo ($F_{\text{máx.}} = S^2_{\text{A}} / S^2_{\text{B}}$), quando necessário, foram transformados em $\log(x + 2)$ e em $(x + 0,5)^{0,5}$, respectivamente. Posteriormente estes dados foram submetidos à análise da variância (ANOVA), e ao teste de separação de médias (SNK a 5%) e quando necessário à análise de regressão, segundo as recomendações de Steel & Torrie (1980), Compton (1994), Sokal & Rohlf (1995).

As análises foram feitas com o auxílio dos softwares Statgraphics e a elaboração de gráficos foi feita através do Microsoft Excel e/ou Harvargraphics. Histogramas e diagramas foram feitos com o auxílio do software Powerpoint. Os registros fotográficos (fotomicrografia) foram feitos em câmara Olympus PM-20 intercambiável ao estereomicroscópio SZH10 e aos microscópios BX-40 (B-max) e invertido IMT-2, ambos da Olympus.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Indução à Embriogênese Somática

O processo de indução da morfogênese *in vitro* na goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana* Berg), foi favorecido pela presença, no meio de cultura, da auxina 2,4-D. Este fitorregulador, em associação com os componentes da formulação salina basal LPM e com a Gln proporcionou a indução e expressão de uma rota de embriogênese somática de altas frequências. Esta rota morfogenética já havia sido relatada para esta espécie nos trabalhos de Cruz et al. (1990), Canhoto e Cruz (1994, 1996 a, b) e Guerra et al. (1997).

Considerando um período médio em que iniciaram os eventos da indução e expressão da embriogênese somática na *F. sellowiana*, a partir de EZ, e que possibilitaram a visualização dos ES, foram feitas as avaliações a partir de cinco semanas da inoculação. Nesta fase, observou-se valores médios baixos da percentagem e número de ES. Estes ES encontravam-se nos estádios globulares (G) cordiformes (C) e torpedo precoce (TP) em mais de 95% das amostras observadas (Fig. 13a, b, c, p.74). Entretanto, o período de maior expressão da embriogênese somática ocorreu dez semanas após a inoculação e mais de 90% destes ES encontravam-se nos estádios de pré-cotiledonar (PCT) e cotiledonar (CT), conforme se observa na Fig. 13a, d, e. Por outro lado, quando a fonte de explantes foi a partir de EZ imaturos, os melhores períodos, em termo de indução da embriogênese somática ocorreram entre 10 a 15 semanas da inoculação. Em trabalho anterior, com esta mesma espécie, observaram-se valores médios de indução à embriogênese somática inferiores a 20% (Guerra et al., 1997). Também no presente trabalho, o processo da embriogênese somática ocorreu, preferencialmente, de forma assíncrona (Fig. 13e), da mesma maneira que o processo descrito em *E. edulis* por Guerra & Handro (1998, 1991).

Quanto às demais fontes de explantes, utilizadas no presente trabalho (item 4.1.), observou-se uma intensa proliferação de massas celulares, originadas a partir da base das pétalas, base do filamento dos estames e dos estigmas e na região do ovário. No entanto, não observou-se a indução da embriogênese somática, até o período de vinte semanas após a inoculação. Resultados semelhantes foram observados por Canhoto e Cruz (1996a) na cultura de anteras, em meio de cultura MS adicionado de 2,4-D (4,52 μ M) e BAP (2,22 μ M), 75 dias após a inoculação. Estes autores verificaram que 10% das anteras inoculadas induziram a formação de massas celulares e, muitas destas proliferações, originaram-se a partir da base das anteras com o filamento.

5.1.1. Acessos

A indução à embriogênese somática, nos cinco acessos de *Feijoa sellowiana* Berg testados no presente trabalho, foi favorecida com a adição ao meio de cultura basal LPm, do 2,4-D (20 μ M). De uma maneira geral, em todos os acessos, estes eventos foram visualizados em torno de quatro semanas após a inoculação. A análise da variância, revelou diferenças significativas ($P < 0,01$) para o parâmetro % de ES, no período de 10 e 15 semanas após a inoculação. No entanto, para o número de ES por explante esta análise exibiu valores significativos ($P < 0,05$) somente no período de 10 semanas da inoculação (Tabela 2, p.82). O coeficiente de variação (CV%) que indica a precisão do experimento revelou, porém, menores valores, quando a coleta de dados ocorreu no período de dez semanas (20,5% e 23,0% para a % de ES e número de ES, respectivamente). Estes valores estão provavelmente relacionados com período de maior expressão da embriogênese somática e de forma sincrônica (Fig. 13c, d), quando comparados com os períodos de cinco semanas (Fig. 13b). No período de quinze semanas esta correlação estava possivelmente ligada à perda de viabilidade dos ES e à falta de sincronia na formação dos ES nesta espécie (Tabela 2; Fig. 13e).

Desta forma, os resultados mostrados na Fig. 2a, p.64, revelam que, em média, as maiores percentagens de indução foram observadas nos acessos: 50-4 (85%), 101 (82,5%) e 152-12x458 (65,0%). Igualmente, como mostra a Fig. 2b, os maiores números de ES por explantes foram observados com os acessos: 50-4 (30 ES), 101 (21,6 ES), 152-12x458 (15,9 ES) e 509 (16,4 ES). Em ambos os parâmetros estes acessos não diferem entre si, para o teste SNK (5%), mas diferem do acesso 53B-7 que revelou as mais baixas taxas (20,0%) e menor número de ES por explante (11,2 ES), em dez semanas após a inoculação.

Contudo, podemos inferir que a embriogênese somática da *F. sellowiana*, medida por estes dois parâmetros, demonstra ser genótipo dependente. Estes resultados são concordantes com aqueles obtidos por Guerra et al. (1997), que já haviam observado respostas diferenciadas na indução e expressão da embriogênese somática de dois genótipos distintos desta espécie. Da mesma forma, em relação ao genótipo, foram verificados respostas semelhantes na indução à embriogênese somática em outras espécies, tal como, em videira (Gray, 1995), em noqueira (*Juglans* spp) por Preece et al. (1995) e no cacauero (Alemanno et al., 1996). Canhoto & Cruz (1996a) mencionaram a existência da interação entre cultivares de Feijoa e os componentes do meio de cultura, especialmente a concentração de sacarose sobre a resposta morfogenética.

No presente trabalho, observou-se também que os acessos 101, 50-4, 152-12x458 e 529, apresentavam uma maior quantidade de explantes com embriogênese somática de alta frequência (Fig. 13d), quando comparados ao acesso 53B-7, que revelou uma embriogênese

somática de baixa frequência (Fig. 13f). Avaliações em períodos posteriores a dez semanas da inoculação, não revelaram incrementos médios significativos. Em alguns casos observou-se um decréscimo, tanto nas taxas como no número de ES por explantes (Fig. 2a, b).

A indução, produção de ES e proliferação de culturas embriogênicas, têm demonstrado diferenças consideráveis entre genótipos de várias espécies. Cinco distintas cultivares de videira apresentaram diferenças na produção de ES e proliferação de linhagens embriogênicas (Gray, 1992). Diferenças significativas na produção de ES foram observadas entre dois diferentes genótipos de alfafa (Parrot & Bailey, 1993), oito diferentes genótipos de soja (Bailey et al., 1993), entre 55 variedades comerciais de melão (Gray et al., 1993), 11 diferentes cultivares de *Citrus* (Carimi et al., 1995) e 15 diferentes genótipos de *Picea* (Merkle et al., 1995). Já em algodão foi observado um número limitado de genótipos que produziram ES (Gonzalez-Benito et al., 1997).

5.1.2. Otimização do Meio de Cultura Básico

5.1.2.1. Definição da Formulações Salinas

A utilização de explantes a partir de EZ extraídos de frutos imaturos, coletados no período de 75 a 120 dias após a antese, resultou num padrão de resposta diferenciado em relação aos EZ maduros. Embora os eventos da expressão da embriogênese somática iniciaram com um incremento nas taxas de ES (28,1%) e números de ES por explante (5,9 ES), esta evolução não ocorreu nos períodos posteriores, quando comparados com os mesmos parâmetros avaliados no ensaio anterior (item 5.1.1.). Contudo, avaliações em vinte semanas após inoculação foram necessárias, principalmente porque o potencial de resposta de 10 para 15 semanas, apresentou um incremento médio de 10% nas taxas de ES. Além disto, as culturas apresentavam baixas taxas de indução, quando comparadas com os resultados obtidos no ensaio anterior (ver item 5.1.1). Respostas semelhantes com esta mesma fonte de explantes, foram observados por Guerra, et al. (1997) que, na transição de 15 para 20 semanas de cultivo observaram um acréscimo médio de 20 % nos valores de indução.

Conforme se observa na Tabela 3, p.83 em ambos os parâmetros e períodos de avaliações, a análise da variância revelou diferenças significativas ($P < 0,01$) entre os níveis de Gln adicionado ao meio de cultura basal. Para o fator formulação salina esta análise revelou diferenças significativas ($P < 0,05$) para o parâmetro percentagem de explantes com ES, quinze e vinte semanas após a inoculação. Para o número de ES por explante, a análise estatística revelou significância em dez, quinze ($P < 0,01$) e vinte semanas ($P < 0,05$) após a inoculação. Considerando os níveis de 2,4-D e a interação entre os fatores formulação salina versus Gln,

para a % de ES e número de ES, esta análise revelou diferenças significativas ($P < 0,01$ e $P < 0,05$, respectivamente) no período de vinte semanas após a inoculação. Observa-se também na Tabela 3, que os valores do CV (%), revelaram um controle satisfatório do erro experimental para este padrão de resposta. A menor variação (7,8%) ocorreu no período de quinze semanas para % de ES. Contudo, para o número de ES este CV foi maior no período de dez semanas (31%).

As melhores taxas médias de explantes com ES (55,5%) e maior número médio de ES por explante (13,7 ES/explante), foram observados no período de quinze semanas após a inoculação (Tabela 4, p.84 e 5, p.85). Neste período também observou-se um aumento na viabilidade dos ES pela diferenciação dos estádios iniciais para os estádios finais, pré-cotiledonar a cotiledonar (Fig. 13a, d, e).

A suplementação ao meio de cultura basal com a Gln (4 mM), proporcionou resultados de indução a embriogênese somática, que diferem estatisticamente, segundo teste SNK (5%), em ambos os parâmetros e períodos de avaliações, quando comparados com a ausência deste aminoácido (Tabela 4 e 5). Na Fig. 3, p.65, observa-se mais claramente as intensidade de respostas para os níveis de Gln utilizados. Observou-se que a evolução das taxas de indução, bem como os números de ES por explante foi significativa quando submetida à adequação dos modelos quadráticos (análise de regressão), para os dois parâmetros e níveis de Gln. Pode-se também visualizar a trajetória descrita pelas suas respectivas equações e suas distribuições de pontos, bem como a confiabilidade destas trajetórias que foram expressas pelos altos valores (maior de 0.95) dos coeficientes de determinação (r^2) e a significância destes coeficientes (Tabela 20, p.98). É importante mencionar que para sistemas biológicos como o apresentado no presente trabalho, consideram-se altos aqueles valores de r^2 que ocorrem entre 0,5 e 0,9 (Compton, 1994).

Para a percentagem de ES, os pontos máximos segundo as derivações das respectivas equações, foram observados em 14,6 semanas de cultivo (63,9%) e 15,4 semanas de cultivo (44,4%) em meios de cultura com e sem Gln, respectivamente (Fig. 3a). Já, para taxa de produção de ES por explante, os pontos máximos foram observados em 12,8 semanas de cultivo (20,7 ES) e 13,2 semanas de cultivo (10,5 ES), em meios de cultura com e sem Gln, respectivamente (Fig. 3b). Há que se considerar, contudo, que quando se pretende obter o maior número de ES viáveis em estádios adequados de desenvolvimento, intervalos de avaliação de 12 a 15 semanas estão correlacionados com maiores taxas de conversão dos ES em plântulas. A partir deste período ocorre uma redução acentuada na qualidade dos ES, provavelmente, pela redução das condições nutricionais, depleção de fitorreguladores, além da redução nas concentrações de Gln (Pedrotti et al., 1994).

A utilização da formulação salina LPm resultou nas taxas médias mais altas de indução

de embriogênese somática (% de ES) em todos os períodos de avaliação. Conforme se observa na Tabela 4, a formulação salina LPm induziu valores médios de 52,9% de ES, que diferiram estatisticamente, segundo o teste SNK (5%), dos valores obtidos com a formulação MS (41,6 % ES), e não diferiram dos valores observados com a formulação WPM (45,6 % ES), vinte semanas após a inoculação. Considerando que o parâmetro número de ES por explante expressa a taxa de regeneração *in vitro*, ele é considerado como o parâmetro de maior importância. A Tabela 5 revela que o emprego da formulação salina LPm resultou em valores estatisticamente diferentes pelo teste SNK a 5%, nos períodos de dez (21,1 ES), quinze (24,5 ES) e vinte (11,2 ES) semanas após a inoculação, quando comparados com os resultados obtidos com as formulações salinas MS e WPM.

O emprego da formulação salina LPm têm demonstrado bons resultados na indução à embriogênese somática em coníferas, principalmente em *Picea glauca* e *P. engelmannii* (Roberts et al., 1990), *P. rubens* (Harry & Thorpe, 1991) e *P. glauca engelmannii* (Carrier et al., 1997). Nestes casos, foram observados que a indução à embriogênese somática e os melhores valores na produção de ES, foram favorecidos com a utilizando da formulação LPm. Segundo Dunstan et al. (1995), esta formulação foi utilizada preferencialmente para a indução embriogênética em espécies do gênero *Picea*. Para angiospermas lenhosas perenes a preferência têm sido pela utilização da formulação salina MS. Em trabalho feito inicialmente com *F. sellowiana*, os melhores resultados de indução da embriogênese somática foram obtidos com o meio de cultura ½ LP (von Arnold & Erikson, 1977), com os níveis de Ca^{++} alterados para 0,7 mM. (Guerra et al., 1997).

Apesar da formulação salina WPM ter sido desenvolvida mais especificamente para espécies lenhosas, poucos relatos demonstram a sua utilização nestas espécies e nenhuma espécie de angiosperma foi relatada como responsiva à formulação LPm (Dunstan et al., 1995). Por outro lado, as formulações salinas Y3 e MS proporcionaram resultados semelhantes na indução da ES em *Euterpe edulis* (Guerra & Handro, 1991). A utilização das formulações salinas MS e N tem demonstrado bons resultados na indução e produção da ES em videira (Gray, 1995).

Níveis de 2,4-D (10 μ M) adicionados aos meios de cultura basal, promoveram a indução da embriogênese somática em taxas significativamente superiores (51,4 % ES) àquelas observadas com a concentração de 20 μ M (42 % ES), segundo o teste SNK, vinte semanas após a inoculação (Tabela 4). Observa-se também nesta Tabela que o 2,4-D (10 μ M) proporcionou melhores taxas de indução embriogênética que, contudo, não diferiram entre si, segundo o teste SNK (5 %) dos resultados obtidos com o 2,4-D (20 μ M) em 5, 10 e 15 semanas após a inoculação. Para o parâmetro número de ES por explante, observou-se que a adição de 2,4-D (20 μ M) ao meio de cultura resultou em valores mais elevados que, contudo,

não diferenciaram daqueles obtidos com o 2,4-D a 10 μM (Tabela 5). Em trabalhos realizados com esta mesma espécie, o maior número de ES por explantes foi observado com o meio de cultura basal MS, adicionado de 2,4-D (4,5 μM) e com o aumento do nível de sacarose para 0,3 M (Canhoto e Cruz, 1994), ou com o acréscimo de Kin (0,1 μM) ao meio basal (Canhoto e Cruz, 1996a, b).

Embora, com relação às interações entre as formulações salinas e os níveis de 2,4-D, a análise da variância não tenha revelado diferenças significativa, em todos os períodos de avaliações realizados neste ensaio, é importante mencionar que a otimização dos nutrientes salinos, nos meios de cultura, pode tornar possível a redução na concentração de fitorreguladores a serem adicionados a estes meios. Aparentemente os constituintes salinos podem corrigir em parte o desbalanceamento dos fitorreguladores das formulações em uso atualmente (Preece, 1995).

Com a utilização da formulação salina WPM adicionada de um balanço de 2,4-D e TDZ, observou-se os melhores resultados na formação de ES em noqueira-pecan (*Juglandaceae*) (Merkle et al., 1987), em *Juglans nigra* (Neumam et al., 1993). Em várias espécies de noqueira (*Juglans spp.*), Deng & Comu (1992) obtiveram os melhores resultados de indução a embriogênese somática com o meio de cultura basal DKW isento de fitorreguladores e Preece et al. (1995) demonstraram a importância do balanço citocinina/auxinas adicionados aos sais DKW ou WPM para obterem os melhores resultados na indução à embriogênese somática em *Juglans regia*. As formulações salinas MS e N adicionadas de um balanço de auxinas e citocininas, demonstraram bons resultados na indução da embriogênese somática em várias espécies de videira (Gray, 1992 e 1995). Para a iniciação das culturas embriogênicas em *Carica pubescens*, Jordan & Velozo (1996) utilizaram a formulação salina NN (Nitsch e Nitsch) adicionado de ANA e BAP e a transferência para meio basal WPM adicionado 2,4-D, BAP ou zeatina, foram observadas as maiores percentagens de formação de ES. Porém, Gonzalez-Benito et al. (1997) observaram a indução de calo a partir de EZ de algodão com 2-iP (2,45 μM). Quando estes calos foram transferidos para 2,4-D (0,45 e 22,5 μM) e posteriormente para meio de cultura MS livre de fitorreguladores ocorreu a diferenciação dos ES.

Já em *Citrus* o BAP (13,3 μM), adicionado aos sais MS, proporcionou um maior número de ES (Carimi et al., 1995). Em *Ginkgo biloba*, esta rota morfogênica também foi obtida com a adição de BAP (10 μM) à formulação salina MT. Nesta espécie, balanços de ANA e BAP promoviam preferencialmente a formação de calo (Laurain et al., 1996). Em gerânio observou-se que a adição do BAP (2 μM) aos sais GCM aumentou a quantidade total de ES (Wilson et al., 1996).

Em *Eucalyptus citriodora* os melhores resultados de indução à embriogênese somática foram observados com a formulação salina B5, comparativamente à utilização dos sais MS e

adição de 16,2 μM ao meio de cultura do ANA, resultando em valores superiores de indução em relação ao 2,4-D (Muralidharan & Mascarenhas, 1995). Estes autores também verificaram, nesta Mirtaceae, que a utilização do meio basal B5 resultou em maior produção de ES, quando comparada com os meios basais MS, White e WPM. No entanto Preece et al. (1995) utilizaram uma combinação de $\frac{1}{2}$ WPM e $\frac{1}{2}$ DKW para incrementar a produção de ES em *Juglans nigra*. Em amendoim não foram observadas diferenças significativas na percentagem e número de ES, quando foram utilizadas as formulações salinas MS ou FN, mas foram observadas diferenças em resposta aos níveis de 2,4-D (Baker & Wetzstein, 1995).

Ao considerarmos as interações entre os fatores formulação salina e Gln, pode-se observar nas Tabela 4 e 5 que as maiores percentagens de ES e número de ES foram proporcionadas com a adição de Gln à formulação salina WPM (64 % e 12,6 ES), mas não diferiu (teste SNK a 5 %) dos resultados obtidos com a adição da Gln à formulação salina LPm (53,4 % e 12,3 ES) e com o meio MS adicionado de Gln (46,7% 5,2 ES), seguido dos resultados obtidos com o meio LPm isento de Gln (52,4 % e 10,1 ES), respectivamente, vinte semanas após a inoculação. Observamos, também, que as menores taxas de indução e produção de ES foram resultantes do emprego dos sais MS e WPM isentos de Gln.

Gyulai et al. (1992) testaram 11 diferentes composições salinas para a indução à embriogênese somática de uma espécie de gramínea híbrida. Estes autores verificaram que os melhores resultados na diferenciação e desenvolvimento dos ES foram obtidos com a formulação salina MS modificada para as concentrações de NH_4NO_3 (956 mg/l), KH_2PO_4 (1160 mg/l), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (96 mg/l), eliminando-se o KNO_3 . As variações das concentrações de sacarose, NH_4^+ e agentes geleificantes, adicionados ao meio de cultura DS-5, resultaram em um maior controle na indução da embriogênese somática em *Daucus carota* (Smith & Krikorian, 1990).

5.1.2.2. Fontes de Nitrogênio Inorgânico e Orgânico

Influência dos Níveis de NH_4^+ , NO_3^- e Glutamina

O padrão de resposta de indução da embriogênese somática verificado neste ensaio, foi semelhante ao observado no ensaio anterior (item 5.1.2.1). A análise da variância exibiu valores com diferenças significativas ($P < 0,01$), para a presença de Gln ao meio de cultura basal. Igualmente, para a relação de $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ os resultados obtidos revelaram diferenças significativas ($P < 0,01$), para os dois parâmetros testados nos períodos de 10 e 15 semanas da inoculação. No entanto, observou-se que a interação entre relação $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ e os níveis de Gln exibiram valores com diferenças significativas ($P < 0,01$) somente para o parâmetro % de

ES, no período de quinze e vinte semanas após a inoculação (Tabela 6, p.86). Observa-se também, nesta Tabela que o CV (%) apresentou, o mesmo comportamento e valores semelhantes ao item 5.1.2.1, por terem sido empregados, em ambos os casos, as mesmas fontes de explantes (EZ imaturos).

Novamente a adição de Gln ao meio de cultura basal, resultou em valores médios que diferem estatisticamente (teste SNK a 5 %), em ambos os parâmetros e períodos de avaliações, quando comparados aos valores obtidos com meios de cultura isentos deste aminoácido (Tabelas 7, p.87 e 8, p.88). Os maiores valores de % de ES (34,0 %) e número de ES (12,5 ES) foram observados com a presença de Gln no meio de cultura (4 mM), no período de quinze semanas após a inoculação.

Na Fig. 4, p.66, observa-se as curvas resultantes dos dois parâmetros e níveis de Gln. O modelo quadrático foi o mais adequado para explicar a evolução da taxa de indução (% de ES) e do número de ES formados, nos tratamentos contendo de Gln, em relação ao tempo de cultivo. Os valores dos coeficientes de determinação (r^2) descrevem a confiabilidade da trajetória descrita pelas suas respectivas equações, bem como a significância de seus coeficientes (Tabela, 20). As derivações das respectivas equações permitem inferir valores máximos de 34,1 % de indução embriogenética depois de 16,9 semanas em cultura e de 12,1 ES/explante depois de 13,4 semanas em cultura, em resposta ao meio de cultura adicionado de 4 mM de Gln (Fig. 4a, b).

Neste ensaio, comparativamente aos resultados obtidos com aqueles descritos no item 5.1.2.1, particularmente quanto ao mesmo tratamento (formulação salina LPm adicionado de 20 μ M de 2,4-D e 4 mM de Gln), houve uma redução no potencial de indução embriogênica de 54,4% na percentagem média de formação dos ES (65,6 para 42,5 % de ES) e 26,1% no número médio de ES (34,3 para 27,2 ES por explante), respectivamente. Esta diferença pode estar relacionada às alterações fisiológicas que podem ter ocorrido nos explantes em função do transporte e temperaturas inadequadas no armazenamento dos frutos jovens, dos quais foram excisados os explantes para este ensaio. Canhoto & Cruz (1996a) no seu trabalho de indução embriogenética recomendam o armazenamento dos frutos imaturos de *F. sellowiana* a 4° C por alguns meses.

As proporções dos íons $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ (15:34 mM ou 30:70%), na constituição básica da formulação salina LPm, proporcionaram, de uma forma geral, os melhores resultados nas taxas médias de indução embriogenética (27,5 e 42,5%) e número médio de ES (16,2 e 20,4 ES/explante) em dez e quinze semanas, respectivamente (Tabela 7 e 8). No entanto, estes valores não diferem estatisticamente, para o teste SNK a 5%, dos valores proporcionados pelas proporções 34:15 (70:30%) e 00:49 (0:100%), nos mesmos parâmetros e períodos de avaliações. Igualmente, pode-se observar a interação entre as proporções $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ e níveis

de Gln para a % de ES no período de quinze semanas após a inculação (Tabela 7). Quando a proporção foi 100% de NO_3^- , os números médios de ES produzidos diferiram segundo teste SNK (5%), quando comparados com 100% de NH_4^+ a partir da avaliação feita após dez semanas em cultivo (Tabela 8). Neste caso, quando a proporção é 100% de NO_3^- , ocorre a formação de massa celular escura e a partir desta originam-se os ES (Fig. 14a, p.75). Enquanto que na proporção de 100% de NH_4^+ resultou em baixa taxa de proliferação celular, de coloração escura e inibiu a progressão dos ES para os estádios finais de desenvolvimento (Fig. 14b).

Estes resultados são similares àqueles obtidos por Niedz (1994), que observou as melhores taxas de crescimento de massa celular de *Citrus sinensis* cv. Hamlin, quando foram utilizadas proporções de 50 a 90% de nitrato em relação ao amônio. De acordo com Thompson & von Aderkas (1992), níveis maiores que 20 mM de NH_4NO_3 , adicionados ao meio basal, exerceram efeito negativo na iniciação de culturas embriogênicas em *Larix occidentalis*. Meio basal MS líquido adicionado de 10 mM NH_4NO_3 , permitiu a iniciação dos embriões em pimentão (Buyukalaca & Mavituna, 1996). Já, Wilson et al. (1996), observaram em gerânio um aumento nas taxas de formação de ES normais no estágio cotiledonar, quando eram utilizadas baixas concentrações de NH_4NO_3 (1,89 mM) e altas concentrações desta substância resultaram em maiores quantidades de ES anormais em gerânio.

O NO_3^- influi no metabolismo do nitrogênio e carboidratos e a relação C/N controla inúmeros fatores fisiológicos, além da organização e desenvolvimento celular (George, 1993; Lea, 1993; Salisbury & Ross, 1994). Em meio de cultura, o NO_3^- promove o aumento do pH, pela excreção de HCO_3^- ao meio externo. Enquanto que, na presença de NH_4^+ no meio de cultura, há a liberação de H^+ ao meio externo, promovendo a redução do pH (Durzan, 1987; Kirby et al., 1987; Smith & Krikorian, 1990; Niedz, 1994; Archambault et al., 1995).

No presente trabalho, pode-se observar que a presença da Gln, como única fonte de N no meio de cultura, substituiu os efeitos das fontes inorgânicas, resultando em valores estatisticamente semelhantes, segundo teste SNK (5%), aos resultados obtidos com os tratamentos nos quais foram mantidas as proporções de $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ e níveis de Gln (Tabela 7 e 8). Os resultados obtidos diferem, segundo este mesmo teste, quando comparados com os resultados observados nas proporções 00:00 (2,5%) e 49:00 (0%) e na ausência de Gln (Tabela 7). Proporções de 10:20 mM de $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ suplementado com água de coco (10%), ao meio de cultura basal, resultou em maiores números de ES em *Cyclamen persicum* a partir de antera (Kiviharju et al., 1992). No entanto, segundo estes autores, quando a fonte de explantes era a partir de ovários, os melhores resultados foram observados com a proporção inversa (20:10 mM) destes íons. Porém, Buyukalaca & Mavituna (1996) observaram uma redução na produção de embriões somáticos em *Capsicum annum*, com explantes a partir de EZ

maduros, quando adicionaram ao meio MS proporção maior de NH_4^+ (40 mM) em relação ao NO_3^- (20 mM). Da mesma forma, Ozawa et al. (1996) observaram que a capacidade embriogênica dos pequenos grupos de células de um híbrido de *Oryza sativa*, reduziam com o aumento dos níveis de NH_4^+ .

Portanto, em goiabeira serrana parece ser fundamental o ajuste do balanço das formas reduzidas e oxidadas de N, associada à adição de Gln aos meios de cultura. Porém, com a eliminação do nitrogênio no meio de cultura ou na presença apenas de NH_4^+ , as respostas observadas foram a ausência ou reduzida quantidade de massa celular embriogênica e a formação de massas celulares com coloração escura, (Fig. 14c). No entanto, quando adicionou-se Gln ao meio de cultura, observou-se a formação de massa celular friável, mas com baixa frequência de ES (Fig. 14d). Resultados semelhantes quanto à utilização de NH_4^+ e de NO_3^- , de forma isolada, em meio de cultura, foram obtidos por Canhoto & Cruz (1996a) em *Feijoa sellowiana*. Estes autores observaram que nestas condições a frequência de indução da embriogênese somática era reduzida, porém, a adição de caseína hidrolisada, a estes meios de cultura, incrementou a formação de ES. Em outras espécies como cenoura (Wetherell & Dougall, 1976), alfafa (Stuart & Strickland, 1984a, b) e algodão (Gonzalez-Benito et al., 1997), a adição de Gln ao meio de cultura foi fundamental para o desenvolvimento da embriogênese somática e pôde substituir de forma parcial ou total as fontes de NH_4^+ . Neste sentido, George (1993) enfatizou a importância da adição de aminoácidos aos meios de cultura, principalmente para substituir os íons NH_4^+ ou para aumentar os níveis de nitrogênio reduzido, que foram necessários para o desenvolvimento da embriogênese somática em várias espécies cultivadas *in vitro*.

Resultados similares aos anteriores foram observados por Archambault et al. (1995), na cultura de ES de cenoura em sistemas de biorreatores. Estes autores verificaram um aumento significativo na produção de ES à medida que aumentavam os níveis de NH_4^+ no meio de cultura, sendo que os melhores resultados foram obtidos com a concentração de 15 mM deste íon. Em alfafa 10 mM de NH_4^+ foram suficientes para formação de embriões somáticos (Stuart & Strickland (1984b). Já, Smith & Krikorian (1989, 1990) observaram melhor crescimento e manutenção das culturas de pró-embriões somáticos pré-globulares de cenoura com a adição de 1 a 5 mM de amônio ao meio de cultura. Estas respostas foram atribuídas a uma alteração no pH do meio durante o cultivo. Sabe-se que o aumento das proporções de amônio promovem a acidificação do meio de cultura e que aumentando-se a proporção de nitrato o pH do meio torna-se mais básico (Durzan, 1987; Kirby et al., 1987; Smith & Krikorian, 1989, 1990; Niedz, 1994; Archambault et al., 1995). Assim sendo, meios de cultura livre de fitorreguladores com a adição de 1 mM de NH_4^+ e com controle de pH do meio, permitiram uma ótima manutenção das culturas embriogênicas e favoreceram a progressão dos ES de cenoura para os estádios

subsequentes (Smith & Krikorian, 1990).

Fonte de Aminoácidos

No presente trabalho, a indução da embriogênese somática foi favorecida pela suplementação ao meio de cultura basal com Gln, Asparagina (Asn) e Arginina (Arg). Observou-se também que o potencial embriogênico foi mantido mesmo com o armazenamento das sementes em geladeira por 18 meses. O tempo de cultivo de dez semanas após a inoculação foi o mais adequado para se obter as melhores respostas na embriogênese somática, a partir de explantes extraídos de frutos maduros.

A análise da variância revelou diferenças significativas para o parâmetro % de ES ($P < 0,01$), mas não revelou diferenças para o número de ES, com a adição dos aminoácidos (Gln, Asn e Arg) suplementados ao meio de cultura basal após dez semanas de cultivo. (Tabela 9, p.89). As melhores taxas de indução e número de embriões somáticos foram proporcionadas pela adição ao meio de cultura da Asn (86,9% e 40 ES/explantes), seguido da Gln (79,4% e 39,4 ES/explantes) e da Arg (67,5% e 29 ES/explantes). Valores de percentagem de ES diferiram estatisticamente, segundo teste SNK (5%), do tratamento testemunha (LPm) que resultou nos menores valores para estes parâmetros (45% e 16,7 ES/explantes) (Fig. 5, p.67).

Resultados semelhantes para esta mesma espécie foram obtidos por Guerra et al. (1997), como resposta à adição de Gln e caseína hidrolisada (CH) ao meio de cultura. Estes autores observaram que à embriogênese somática foi favorecida pelo emprego destes compostos. Fontes de aminoácidos fornecem ao meio de cultura, principalmente, uma maior quantidade de nitrogênio reduzido (George, 1993).

Merkle et al. (1987) verificaram que os melhores resultados de indução e formação de ES em noqueira-pecan, foram obtidos com a adição da CH ao meio basal, quando comparados com Gln. Contrariamente, Neumam et al. (1993) substituíram a CH por Gln e obtiveram os melhores resultados embriogenéticos em *J. nigra*. Por outro lado, a adição ao meio basal uma combinação de CH (500 mg/l) e Gln (3,4 mM) aumentou o número de ES em *Eucalyptus* (Muralidharan & Mascarenhas, 1995). Buyukalaca & Mavituna (1996) observaram também que a adição de aminoácidos ao meio de cultura favoreceu a iniciação e a formação dos ES em *Capsicum annum*. Estes autores observaram que a adição de 6 g/l de prolina proporcionou a diferenciação de ES nos estádios de torpedo em maior quantidade. Stuart & Strickland (1984b) já haviam observado um forte sinergismo entre prolina e amônio na cultura de células embriogênica de alfafa, e que estes fatores poderiam ser explorados para aumentar a produção de ES. Fontes de N a partir de aminoácidos são prontamente assimilados e

incorporados aos esqueletos carbônicos durante o metabolismo e síntese das proteínas, quando comparados com outras fontes de N, que resultam num maior gasto energético pelos explantes (Adiga & Prasad, 1985; Durzan, 1987; Bagni & Biondi, 1987; Lea, 1993).

Níveis de Gln

Para os níveis de Gln utilizados, a análise da variância exibiu valores com diferenças ($P < 0,01$) nos dois parâmetros de avaliação, dez semanas após a inoculação (Tabela 10, p.89). A adição da Gln ao meio de cultura resultou em valores superiores para os dois parâmetros, quando comparados com os resultados obtidos com o meio de cultura sem este aminoácido (Fig. 6, p.67). Observa-se também nesta figura que, para os parâmetros % de ES e número de ES por explantes, as melhores médias foram obtidas pelas suplementações com Gln 8 mM (71,2% e 54,8 ES), 6 mM (79,4% e 46,2 ES) e 4 mM (73,1% e 39,4 ES). Estes valores diferem (segundo teste SNK 5%) dos resultados obtidos no tratamento livre de aminoácidos (45% e 16,7 ES por explantes).

Pode-se observar também na Fig. 6 a evolução das taxas de embriogênese somática (% de ES e número de ES) em função dos níveis de Gln. O ajuste das curvas pela análise de regressão revelou-se altamente significativo ($P = 0,01$) para o número de ES e significativo ($P < 0,05$) para o % de formação de ES, à adequação dos modelos quadráticos, bem como a significância de seus coeficientes (Tabela 20), dez semanas após a inoculação. Observa-se também na Fig. 6 as distribuições de pontos, suas respectivas equações e os coeficientes de determinação (r^2). Segundo as projeções teóricas das respectivas equações, apresentadas nesta figura, pode-se inferir que a taxa máxima (% de ES) seria alcançada com a adição ao meio de cultura básico de 5,4 mM de Gln (79%). No entanto, segundo esta mesma projeção, a produção máxima de ES por explante pode ser obtida com a adição de 33 mM de Gln (110,7 ES/explantes). Ao observarmos os coeficientes de determinação (r^2) de 95,5% e 97,8% destes resultados são explicados pela trajetória destas equações, respectivamente, em dez semanas de cultivo (Fig. 6).

A adição de aminoácidos ao meio de cultura e à concentração adequada varia para cada espécie, tipo de órgão, tecido ou estrutura celular utilizada (Pedrotti et al., 1994), ou resposta morfogênica desejada (George, 1993). Merkle et al. (1995) relataram que a adição de aminoácidos ao meio de cultura pode ter efeito neutro ou de inibição no desenvolvimento de embriões somáticos de alfafa, enquanto que em outras condições, pode promover um incremento no número de ES e eventualmente em sua conversão. Lai et al. (1992) verificaram um aumento significativo na síntese de proteínas e peso seco dos ES quando adicionou-se ao meio de cultura Gln (50 mM) em relação ao meio isento deste aminoácido. González-Benito et

al. (1997) observaram a formação de embriões somáticos, quando os calos de algodoeiro eram transferidos para meio de cultura basal MS livre de fitorreguladores e suplementado com 13,7 mM de Gln.

5.1.3. Influência do Tempo de Exposição ao 2,4-D

Mesmo com o armazenamento por 12 meses em geladeira, os embriões zigóticos mantiveram alto potencial para indução à embriogênese somática, revelando valores médios elevados na % de ES (82 %) e número médio de ES (49,5 ES/explantes). A análise da variância revelou a existência de diferença significativa ($P < 0,01$) em função do tempo de exposição ao 2,4-D, em ambos os parâmetros avaliados e seus respectivos períodos de avaliação (Tabela 11, p.90). Nesta tabela observa-se também que os CV (%) de 9,7 % (% de ES) e 18,2 % (número de ES), para o período de dez semanas após a inoculação, indicam um controle adequado das condições experimentais.

Conforme se observa nas Fig. 7a, b, p.68, pulsos de 2,4-D de uma semana foram suficientes para promover a indução à embriogênese somática em 52,5 % dos explantes, observando-se, em média, 18,4 ES por explante, dez semanas após a inoculação. Estes valores foram superiores aos observados por Cruz, et al. (1990) com este mesmo período de exposição, estes autores verificaram que menos de 30 % dos explantes induziram a formação de embriões em 12-13 semanas após a inoculação. Estes autores verificaram também que pulso de 5 dias em 2,4-D, foi o tempo mínimo de exposição para iniciar a expressão da embriogênese somática (<10 %). Observa-se também que pulsos de duas semanas deste fitorregulador promoveram valores médios de 92,5 % de ES e 64,7 ES/explantes (Fig. 7a, b). Estes valores que não diferiram estatisticamente dos valores obtidos em pulsos de quatro semanas (92,5 % de ES e 41,4 ES/explante) e oito semanas (95 % de ES e 77 ES/explante), segundo teste SNK (5 %). Neste caso observou-se baixo desenvolvimento de massa celular e a formação dos ES deu-se de forma direta a partir da região cotiledonar (Fig. 14e). Este grupo de células foram denominadas de "células embriogênicas" e que não requerem longas exposições em auxinas para promover a produção de ES (de Jong et al., 1993). E que estas células, em condições de estímulos adequados, podem ser induzidas em células competentes que pelo seu desenvolvimento formam os grupos de células embriogênicas e finalmente resultam na formação de ES (Toonen et al., 1994 e 1996).

A Fig. 8, p.69, mostra a evolução das taxas de indução e a quantidade de ES produzidos por explantes, para cada tempo de exposição ao 2,4-D. Observa-se também suas respectivas distribuições de pontos, as equações e coeficiente de determinação (r^2). Ambas foram submetidas à adequação dos modelos quadráticos (análise de regressão), em função do

tempo de cultivo, com base no teste de significância dos coeficientes (Tabela 20). Por meio delas pode-se inferir que a exposição de oito semanas em 2,4-D pode promover taxas máximas de 98,3 % de ES em 13,5 semanas de cultivo, seguida pela exposição de quatro e duas semanas (93,7 % e 86,4 % de ES), em 11,9 e 10,7 semanas de cultivo, respectivamente. Observa-se também que períodos de exposições ao 2,4-D, superiores a oito semanas, não promoveram incremento nos parâmetros avaliados. Resultados semelhantes para diferentes tempos de exposição a esta auxina foram obtidos por Cruz et al. (1990). Contudo, estes autores verificaram que exposições mais prolongadas a este fitorregulador, promoveram a proliferação celular e contribuíram para a formação de ES anormais e poderiam contribuir para a redução nas taxas de conversão dos ES. Jordan & Velozo (1996) observaram as melhores percentagens de indução e formação de ES em *Carica pubescens* com pulsos de 6 dias em 2,4-D (4,97 μM) combinado com BAP (1,78 μM).

No presente trabalho, quanto menor o tempo de exposição ao 2,4-D, mais rápida foi a diferenciação e progressão para o estágio cotiledonar (Fig. 13a, e; Fig. 14f), para o qual baixa conversão em plântulas era observada. Neste caso, a adequada manipulação do 2,4-D no meio de cultura pode permitir a rápida progressão para os estádios de torpedo a torpedo tardio ou pré-cotiledonar, estádios estes que resultaram em maior potencial para a conversão em plântulas. Esta precocidade nas respostas pode resultar numa maior viabilidade econômica na produção de ES, além de ser um sistema de cultivo alternativo para futuras aplicações comerciais.

5.1.4. Estádio de Desenvolvimento dos EZ

Este item foi desenvolvido através de uma análise de dados coletados nos ensaios de indução a embriogênese somática. O meio de cultura selecionado para a coleta de dados, foi baseado na formulação salina LPm adicionada de 2,4-D (20 μM) e de Gln (4 mM). Explantes originados de EZ extraídos de frutos em diferentes estádios de desenvolvimento determinam claramente o padrão de resposta e a potencialidade de indução e produção de ES. A análise da variância revelou diferenças altamente significativas ($P < 0,01$) entre os tratamentos (dias após a antese), em ambos os parâmetros e períodos de avaliações (Tabela 12, p.91). Pode-se observar também nesta tabela, que os coeficientes de variação (CV %) revelaram um maior controle do erro experimental, quando o número de explantes amostrados que compõe a unidade experimental foi duplicado.

Conforme se observa nas Fig. 9a, b, p.70, a indução da embriogênese somática revelou os maiores números médios de ES por explante (25,7 ES) dez semanas após a inoculação. Explantes excisados de frutos maduros coletados em 135 dias após a antese revelaram

valores de 80,8 % de indução embriogênica e 47,0 ES/explante, enquanto que explantes excisados de frutos fisiologicamente maduros coletados aos 120 dias após a antese revelaram valores de 78,8 % de indução embriogênica e 44,4 ES/explante. Estes valores se diferenciaram, segundo teste SNK (5 %), dos demais valores proporcionados pelos períodos de coleta mais precoces, exceto quando comparados com os valores de 47,5 % de indução embriogênica de explantes coletados aos 105 dias após a antese, que não diferem estatisticamente com os dois períodos de coletas mais tardio.

Pode-se observar também na Fig. 9a, b, as tendências das taxas de indução à embriogênese somática e as quantidades de ES formados por explantes, quando foram empregados EZ extraídos de frutos com diferentes estádios de desenvolvimento (dias após a antese). Contudo, as respostas observadas graficamente, revelaram que à medida que ocorre a maturação dos EZ (períodos de coletas dos frutos), aumentam linearmente as taxas de ES e de forma semelhante nos dois períodos de avaliação (Fig. 9a). Para a diferenciação dos ES, há praticamente um crescimento exponencial, nos períodos de 90 a 120 dias após a antese (Fig. 9b). Estes resultados são discordantes daqueles obtidos por Guerra, et al. (1997) em que os valores de indução embriogênica obtidos com o emprego de EZ imaturos de *F. sellowiana* foram superiores àqueles obtidos com o emprego de EZ maduros, apesar de neste trabalho não ter sido mencionada a época de coleta e o tempo de armazenamento dos frutos (ver item 5.1.5).

Contudo, o parâmetro que realmente expressa as quantidades de ES viáveis (número de ES), determina principalmente que o potencial de resposta dos EZ foi em função do período de coleta em relação ao tempo de cultivo. Desta forma, quando os EZ foram extraídos de frutos em período que antecede a maturação fisiológica (105 dia após a antese), observou-se um acréscimo de 11 ES/explante entre dez e quinze semanas de cultivo. No entanto, ao comparamos com os resultados obtidos com EZ extraídos de frutos fisiologicamente maduros (120 dias), e frutos maduros (135 dias), há uma perda de viabilidade de aproximadamente 3 e 29 ES/explante, respectivamente, neste mesmo período de cultivo (Fig. 9b).

Trabalhos realizados por von Arnold e Hakman (1986) demonstraram que somente 11 % dos embriões zigóticos maduros induziram calos embriogênicos em *Picea* sp. Entretanto, em outro trabalho, von Arnold (1987) melhorou estas respostas alterando a concentração de sais no meio de cultura. Contudo, neste caso ocorreu a degeneração e a perda da capacidade embriogênica dos calos provenientes de embriões maduros após dois meses de cultivo, enquanto que as massas celulares obtidas de embriões imaturos continuaram a crescer e mantiveram a capacidade embriogênica por longos períodos de cultura (von Arnold & Hakman, 1988). Bellarosa, et al. (1992), utilizando embriões maduros de *Picea* sp. cultivados em meio LP, estabeleceu linhagens de calos embriogênicos de crescimento rápido. Quando utilizou-se

EZ imaturos ocorreu a indução de proliferações celulares e a obtenção de embriões somáticos em maior quantidade, quando comparado com as respostas obtidas com EZ maduros de algumas espécies de coníferas (Tautorus et al., 1990; Roberts, 1991; Tremblay & Tremblay, 1991; Joy et al., 1991)

5.1.5. Viabilidade dos EZ durante o Armazenamento a Frio

Quando os EZ foram armazenados em geladeira (4° C) o potencial de indução a embriogênese somática (% de ES) se manteve praticamente estável em até 20 meses quando se compara com o valor médio do experimento de 78,7 %. No entanto, quando se considera o número de ES/explante, este potencial se mantém até 12 meses e resultou em valores médios de 45,3 ES/explante. Para a análise dos dados deste experimento, foram seguidos os mesmos critérios estabelecidos no item 5.1.4. Na Tabela 13, p.91, pode-se observar que, para a % de indução de ES, a análise da variância não exibiu diferenças significativas para os tempos de armazenamento. No entanto, foram observadas diferenças significativas ($P < 0,01$), para o número de ES por explante. Da mesma forma como observado no item 5.1.4, os CV (%) de 8,0 % para a percentagem de ES e 6,6 % para o número de ES, revelaram um excelente controle do erro experimental.

Na Fig. 10, p. 71, pode-se observar as curvas traçadas pelas suas respectivas equações, os coeficientes de determinações (r^2) e ambas foram submetidas à adequação dos modelos quadráticos (análise de regressão), em função do tempo de armazenamento a frio e o teste de significância dos coeficientes podem ser observados na Tabela 20. Desta forma, através das derivações das respectivas equações, pode-se inferir que: 1) para períodos de 5,5 meses de armazenamento a 4° C, obteve-se as taxas máximas de indução à embriogênese somática (80,8 %); 2) a quantidade máxima de ES por explante (56,7 ES/explante) foi obtido com um período máximo de 7,2 meses de armazenamento. Contudo, os dados amostrais observados revelaram as maiores taxas (80 % e 59,6 ES) num período de 12 meses à 4° C (Fig. 10).

Harry e Thorpe (1991), utilizando embriões maduros de sementes armazenadas por 20 anos a -20° C, obtiveram 18 % de indução de calos embriogênicos. Apesar da facilidade e disponibilidade de se utilizar embriões maduros, normalmente há limitações quanto à baixa capacidade responsiva destes explantes. Muralidharan & Mascarenhas (1995) induziram a formação de ES a partir de sementes maduras de *E. citriodora* armazenadas a 4° C por dois anos.

5.1.6. Análise Histológica

Dois padrões básicos de resposta na expressão da embriogênese somática *in vitro* foram observados no presente trabalho: o modelo direto e o indireto. O modelo direto ocorreu na transição entre o período de indução e a proliferação de massa celular, que corresponde ao período que antecede os 24 dias após a inoculação (Fig. 15a, b, c, d, p.76). Estes fenômenos foram observados, eventualmente, depois de dez semanas de cultivo, nos quais foram visualizados ES sobre os explantes, nos estádios de globular a torpedo precoce e, raramente, ocorreram progressões para estádios posteriores (dados não mostrados). A indução e expressão dos estádios iniciais da embriogênese somática foi observada por meio de cortes histológicos efetuados a partir dos dezesseis dias após a inoculação. (Fig. 15a). Em 24 dias, observou-se a formação de ES globulares (Fig. 15b, c) e cordiforme sobre a camada da epiderme (Fig. 15d). De uma maneira geral, a indução dos ES ocorreu a partir de alterações periclinais no plano paralelo de divisões celulares da camada da epiderme e divisões anticlinais a partir das camadas subepidérmicas do tecido cotiledonar dos embriões zigóticos (Fig. 15c). Divisões anticlinais e periclinais foram observados em duas semanas a partir da proliferação da região cotiledonar e foram identificadas nas células subepidérmicas da superfície adaxial do cotilédone (Canhoto & Cruz, 1996b).

Já a formação de ES pelo modelo indireto ocorreu com maior frequência após aos 30 dias e originou-se a partir da intensa proliferação celular das camadas epidérmicas e subepidérmicas do tecido cotiledonar (Fig. 15e, f). Não sendo possível, contudo, visualizar pelas análises histológicas, conjuntamente, os tecidos maternos do explante sobre os quais formavam-se os ES, naqueles tratamentos de pulso de 2,4-D por períodos maiores do que quatro semanas. Neste caso, após 30 dias de cultivo ocorria uma intensa proliferação celular dificultando a fixação, por esta técnica, destas estruturas no mesmo plano de corte. A iniciação e desenvolvimento destes ES foram monitoradas por meio de estereomicroscópio a partir de quatro semanas da inoculação (Fig. 13b, 14a). Em aproximadamente 10 semanas pôde-se identificar ES de alta frequência e no estádio cotiledonar (Fig. 14 e, f).

Esta proliferação celular foi dependente do tempo de exposição dos explantes ao 2,4-D adicionado ao meio de cultura. No presente trabalho, observou-se que uma intensa produção de embriões e baixa proliferação celular surgiram diretamente sobre a camada da epiderme, como resposta aos tratamentos de duas semanas de pulso de 2,4-D, caracterizando-se o modelo direto (Fig. 14e). Após uma semana em meio de cultura basal na presença de 2,4-D e Kin, células meristemáticas, originadas a partir de tecidos florais, adquiriram capacidade embriogênica e estas características também foram encontradas nos EZ jovens (Alemanno et al., 1996).

O desenvolvimento morfológico e anatômico dos embriões somáticos da *Feijoa sellowiana* foi estudado através de técnicas histológicas por Canhoto & Cruz (1996b). Estes

autores observaram a formação dos embriões somáticos a partir da superfície das folhas cotiledonares. Neste processo, os embriões somáticos surgiram diretamente de células simples da epiderme ou a partir de grupos de células meristemáticas próximas à superfície adaxial do cotilédone.

O desenvolvimento dos ES diretamente sobre a superfície do cotilédone e sem a formação de calo também foi observado em *Eucalyptus* (Muralidharan e Mascarenhas, 1995), em *J. nigra* (Neumam et al., 1993) e a partir do hipocótilo em noqueira (Preece et al., 1995) ou de forma indireta com a formação de calo em vários genótipos de noqueira (Preece et al., 1995) e em videira (Gray, 1995). Em *anthurium andraeanum* os ES originam-se de forma direta a partir da diferenciação de complexos celulares proembriônicas do mesófilo da lâmina foliar e também pode surgir a partir de células simples deste explante (Matsumoto et al., 1996).

5.2. Linhagens Celulares

5.2.1. Indução, Estabilização e Multiplicação

Massas celulares translúcidas com superfície granulosa, características de culturas embriogênicas descritas como “massas pro-embriogênicas” (Halperin, 1966; Zimmerman, 1993) ou “células embriogênicas” (de Jong et al., 1993; Merkle et al., 1995), foram individualizadas a partir dos meios de indução (item 5.1.). O surgimento destas culturas foram observadas em períodos posteriores a 10 semanas da inoculação (Fig. 16a, p.77). Em alguns casos observou-se intensa proliferação celular (Fig. 16b), em outros casos ocorreu uma menor proliferação com posterior degeneração das culturas. Estes tipos celulares foram observados em meios de cultura com as formulações salinas LPm, principalmente, e em alguns casos em meio basal MS. A maior frequência de formação destas linhagens foi observada com a adição de 2,4-D (20 μ M) e Gln (4 mM) ao meio basal LPm. Para níveis menores de 2,4-D (10 μ M) de 2,4-D, raramente foram observados nestes mesmos períodos a formação destes tipos celulares.

Quando estas culturas em alta taxa de proliferação eram transferidas para meios de cultura basal LPm geleificado, com níveis mais baixos de 2,4-D (2 a 3 μ M) e na presença de 2-iP (1 μ M), observou-se a formação de novas estruturas pró-embriogênicas, permitindo a estabilização destas culturas e configurando processos de embriogênese repetitiva (Fig. 1A) com a formação de ES globulares (Fig. 16c). Portanto, a multiplicação inicial das culturas foram proporcionadas com sucessivas repicagens em plaqueamento, com o emprego do meio de cultura basal LPm geleificado, adicionado de 2,4-D (2 μ M) e 2-iP (1 μ M). Neste caso, quando estas sucessivas repicagens eram realizadas neste mesmo meio basal e em meios de cultura

contendo concentrações de 3 e 5 μM de 2,4-D, observou-se perda do potencial embriogênético. Nestas concentrações de fitorreguladores observou-se, também, intensas proliferações celulares, porém as massas celulares apresentavam características opacas de coloração branca (tipo penugem), de baixa friabilidade, típica de células não embriogênicas (Fig. 16d). Da mesma forma a presença de Kin (0,5 μM) em substituição ao 2-iP no meio de cultura basal LPM, não demonstrou bons resultados na proliferação celular. Por outro lado, níveis de 1 μM de 2,4-D e de 2-iP, ou a ausência deste fitorreguladores no meio de cultura, permitiram a progressão para os estádios de maturação dos ES. Portanto, estes meios de cultura não favoreceram a manutenção dos ciclos repetitivos de divisão celular, mas indicaram que as reduções gradativas dos níveis de 2,4-D direcionaram para a maturação dos ES, ou seja entraram para o ciclo B (Fig. 1B).

Quando estas culturas foram transferidas para meios de cultura LPM líquido, adicionados de 2,4-D (2 μM) e 2-iP (1 μM), foi possível o estabelecimento de suspensões celulares. Dados obtidos com a dinâmica de crescimento destas cultura revelaram uma taxa de crescimento celular de sete e dez vezes superior ao peso fresco inicial em 30 e 45 dias de cultivo, respectivamente, quando comparados os valores obtidos com meios geleificados (dados não mostrados). No presente trabalho, este sistema de cultivo revelou-se uma estratégia eficiente para a cultura massal de células embriogênicas e para estabelecer ciclos repetitivos de divisão celular como já observado por Guerra et al. (1998), com implicações na propagação clonal em larga escala de genótipos superiores, como afirmado por (Teixeira et al., 1995). Estas culturas, quando submetidas à maturação, resultam na produção de ES de alta frequência (Mercke et al., 1995).

A indução e controle da embriogênese somática repetitiva, associada aos estádios iniciais do desenvolvimento embriogênético (ES globulares), conforme se observa na Fig. 16c, é de fundamental importância para o estabelecimento de ciclos repetitivos de divisões celulares, proposto por Durzan (1988) para obter regeneração de plântulas a partir de culturas de células embriogênicas em suspensão. A clonagem destas células se dá por fenômenos de clivagem formando complexos celulares suspensor-embriônários em gimnospermas ou por gemação de embriões somáticos pré-globulares ou globulares em angiospermas (Guerra et al., 1998). Estes eventos foram claramente induzidos e controlados no presente trabalho, assim como em culturas embriogênicas de cenoura por Smith & Krikorian (1988, 1989 e 1990) em meio basal livre de fitorreguladores. Estes eventos foram também induzidos por Baker & Westzstein (1995) a partir de cotilédones de amendoim cultivados em meio basal adicionado de 2,4-D (20 μM) e em culturas embriogênicas derivadas de inflorescências jovens de *E. edulis* e cultivadas em meio de cultura MS com um balanço de 2,4-D ou ANA com 2-iP por Guerra & Handro (1998).

Na Fig. 11, p.72, observa-se que a dinâmica de crescimento das suspensões celulares,

nas diferentes composições de meio de cultura, foi semelhante aos padrões representados pelas outras células vegetais (cf. Mantell et al., 1994). Meios de cultura contendo 2,4-D ($1 \mu\text{M}$) e 2-iP ($1 \mu\text{M}$) proporcionaram o 'scale-up' das culturas, revelando taxas de crescimento de 21,7 vezes superiores em relação ao volume sedimentado inicial, em 53 dias após a inoculação (Fig. 11a). Neste caso, observou-se que estas taxas já eram atingidas aos 39 dias de cultivo. Já, em meio de cultura basal LPm adicionado de 2,4-D ($2 \mu\text{M}$) e 2-iP ($1 \mu\text{M}$) observou-se uma leve estagnação aos 33 dias, com retomada de crescimento aos 41 dias de cultivo e revelando taxas de crescimento de 18,8 vezes superiores ao inóculo inicial. Porém, meios de cultura basal LPm isentos de fitorreguladores, resultaram em um contínuo crescimento que se prolongou até aos 50 dias e resultou taxas de crescimento menores (13,7 vezes). Neste caso em particular, a densidade de inóculo utilizada foi 5 ml, equivalentes a aproximadamente 0,7 ml de volume celular sedimentado de suspensões celulares originadas do terceiro subcultivo.

A curva de crescimento celular observada em suspensões (Fig. 11a), com o meio de cultura basal LPm adicionado de 2,4-D ($1 \mu\text{M}$) e 2-iP ($1 \mu\text{M}$), permitiu a caracterização das fase lag (9 dias) exponencial (9 dias), linear (21 dias) e estacionária (de 39 a 53 dias de cultivo). Após uma fase de intensa proliferação (fase linear) as culturas diminuíram a intensidade de crescimento (fase de declínio) podendo ocorrer a degeneração ou a lise celular. Esta ocorrência pode ser atribuída às condições de limites impostas pelo esgotamento dos nutrientes no meio de cultura, podendo haver também a acumulação de compostos que inibem o crescimento (Mantell et al., 1994). Em relação a este parâmetro, Buyukalaca & Mavituna (1996), verificaram em culturas de suspensões celulares de pimentão (*Capsicum annuum*), que somente após 60 dias havia o decréscimo das taxas de crescimento.

No entanto, quando neste mesmo meio de cultura, utilizou-se um inóculo inicial de 1,4g (aproximadamente 2,4 ml de células sedimentadas), observou-se uma taxa média de crescimento 4,6 vezes superiores ao volume inicial (Fig. 11b). Observa-se também nesta figura que, apesar da densidade de inóculo ou volume inicial ser 3 vezes superior em relação ao primeiro caso, as taxas de crescimento e o volume final ficaram aquém, em relação aos resultados obtidos com uma densidade de inóculo menor (Fig. 11a), em ambos os tratamentos. Para Teixeira et al. (1995) a densidade de inóculo foi um ponto crítico para o estabelecimento de suspensões celulares embriogênicas. Estes autores observaram que a taxa de crescimento decresceu logaritmicamente com o aumento da quantidade de inóculo.

O cultivo de massas celulares embriogênicas, originadas de suspensões celulares e transferidas para placas de petri, contendo meios de cultura LPm geleificado, livre de fitorreguladores e/ou adicionado de 2,4-D ($1 \mu\text{M}$) e 2-iP ($1 \mu\text{M}$), proporcionou altas taxas de regeneração e multiplicação (Fig. 16e). Grupos de células retidos pelas malhas de menor tamanhos (105 e 250 μm), revelaram um potencial de regeneração superior em meio de cultura

basal geleificado (Fig. 16f), quando comparados aos grupos celulares de tamanho maior (> 500 μm), que demonstraram freqüências menores de regeneração. Por outro lado, grupos de células de tamanho maior (200 a 500 μm) resultam em maiores valores de produção de ES (Ruffoni & Massabó, 1996).

Portanto, a transferência destas culturas celulares de um sistema tipo biorretor para sistema de plaqueamento, proporcionou a manutenção e, principalmente, possibilitou a renovação das culturas do sistema de meio líquido. Desta forma, a partir da quinta repicagem em meio líquido, observou-se uma redução drástica na regeneração e multiplicação celular. Para isto, foi fundamental a alternância de cultivo em meio líquido e geleificado, para maximizar o crescimento das suspensões celulares, como já observado por (Teixeira et al., 1995).

Um outro fator relevante foi a redução ou a eliminação de fitorreguladores presentes no meio de cultura, conforme citado por Guerra et al. (1998). Neste sentido, suspensões celulares originadas de um meio de cultura livre de fitorreguladores, com até 5 subcultivos, quando transferidas para plaqueamento sob o mesmo meio de cultura, mantiveram características embriogênicas e boa capacidade de regeneração. Uma síntese das rotas de obtenção destas linhagens celulares, pode ser observada pela representação esquemática mostrada na Fig. 12.

Porém, na presença de fitorreguladores nestes mesmos subcultivos, observaram-se tipos celulares com perda parcial da capacidade embriogênica (Fig. 17a, p.78), bem como, uma baixa capacidade de regeneração (Fig. 17b). Este aspecto já havia sido notado por Buyukalaca & Mavituna (1996), os quais verificaram que a redução de 9,05 μM para 4,52 μM de 2,4-D no meio de cultura foi necessária para manter as características celulares e capacidade embriogênica em suspensões celulares de pimentão, por períodos superiores a seis meses. Ruffoni & Massabó (1996) verificaram que a adição de 2,4-D (9 μM) na presença de luz, induziu uma maior produção de ES da ornamental *Lisianthus russellianus*, comparativamente aos níveis de 4,5 e 18 μM de 2,4-D.

5.2.2. Maturação

Linhagens celulares embriogênicas com características granulosas são normalmente compostas por pró-embriões pré-globulares (Smith & Krikorian, 1990), conforme se observa na Fig. 17c. No presente trabalho, culturas com estas características, sub-cultivadas a cada 40-50 dias em meio basal LPm geleificado contendo 2,4-D (2 μM) e 2-iP (1 μM) e posteriormente transferidas para meios de maturação LPm livre de fitorreguladores, ou adicionado de 2-iP (5 μM), PEG (10 mM) ou ABA (10 μM) isoladamente, resultaram na formação de ES globulares e torpedo precoce, de alta freqüência e de forma sincrônica aos 30 e 45 dias após a transferência, respectivamente (Fig. 12; Fig. 17d).

Quando as culturas foram originadas de suspensões celulares e submetidas a tratamentos de maturação, observou-se uma seqüência de eventos associados à ontogênese embrionária. Esta seqüência iniciou a partir da multiplicação das culturas em meio LPM isento de fitorreguladores. Posteriormente estas culturas foram transferidas para meios LPM geleificados suplementados com 2-iP (5 μ M) por um período de 30-40 dias e, em seguida, repicadas para meios de cultura LPM adicionados de ABA (10 μ M) ou PEG (10 mM). Com isto foi possível a maturação dos ES de 30 a 50 dias após a transferência, porém de baixa freqüência e assincrônica (Fig. 12; Fig. 17e).

No entanto, Merkle et al. (1995) observaram que a transferência das culturas celulares de meio de cultura líquido para geleificado favoreceu a sincronização na produção de ES em alfafa. Este fator possivelmente está relacionado com o aumento do potencial osmótico, promovendo a desidratação de forma parcial das culturas, da qual induz a progressão para as fases posteriores e maturação dos ES. A sincronização da maturação e a produção de ES é um dos pontos fundamentais definidos por Redenbaugh et al. (1988), para a utilização comercial desta tecnologia e, conseqüentemente, por exemplo, a produção de sementes sintéticas.

Roberts et al. (1990) verificaram que uma parcial desidratação dos ES de *Picea sp* promovia uma germinação sincronizada semelhante à observada na elongação da radícula, coincidindo com a elongação do hipocótilo-cotilédones. Merkle et al. (1995) relataram que a desidratação das culturas pode ser eficiente numa seqüência de tratamentos, para a maturação dos ES de alfafa, trevo e algumas leguminosas forrageiras, mas pode não ser necessário para todas as espécies. Em *Eucalyptus*, a sincronização na formação de ES a partir de suspensões celulares, foi favorecida com a adição de mio-inositol (1 g/l) ao meio de cultura, ao qual pode ser atribuído ao papel de osmoregulador (Muralidharan & Mascarenhas, 1995). Para a progressão dos ES para estágio de desenvolvimento bipolar, foram fundamentais a presença de 2-iP (12,3 μ M) e ANA (0,45 μ M) na cultura de *E. edulis* (Guerra & Handro, 1998).

Segundo Misra (1995), vários autores obtiveram a maturação de ES em coníferas, quando adicionaram aos meios de cultura, uma associação de agentes osmóticos e baixas concentrações de ABA. Este tratamento inibiu a germinação precoce e permitiu a maturação dos ES com alta qualidade e com capacidade de resistir a desidratação para 10-30 % de seu conteúdo de umidade. Entretanto, quando o PEG foi aplicado de forma isolada não ocorreu o acúmulo de substâncias de reservas em ES de cacau (Alemanno et al., 1997). Segundo estes autores, a adição de PEG resultou em baixas taxas de conversão e que esta substância pode apresentar algum efeito fitotóxico aos ES. O uso de Polietilenoglicol (PEG) é mais efetivo que a sacarose e o manitol em proporcionar o estresse osmótico nos meios de maturação de ES de *Picea glauca* (Misra, 1995).

Culturas mantidas na presença do 2,4-D e/ou submetidas a quaisquer outras sequência de tratamentos, apresentaram proliferação celular contínua e não maturaram (Fig. 17f). Este aspecto pode ser atribuído principalmente à presença ou efeito residual do 2,4-D nos meios de cultura, cujas implicações em dificultar a progressão do processo de ontogênese dos embriões somáticos já haviam sido apontadas por Attree & Fowke (1993) e Zimmerman (1993) e em estimular a contínua divisão celular haviam sido assinaladas, entre outros, por van der Linde (1990). Outro fator que pode ter dificultado a maturação, foi o sub-cultivo destas suspensões celulares por mais do que cinco vezes em meio líquido, cujas respostas podem ser observadas pela menor capacidade de regeneração celular e, conseqüentemente, a perda da capacidade embriogênica.

5.3. Análise Histoquímica

Análises de linhagens celulares originadas da multiplicação em suspensão celular por três a quatro subcultivos, revelaram que as características estruturais observadas nas células são tipicamente de células embriogênicas, com base na definição de Jong et al. (1993). Estas células apresentavam-se de tamanho pequeno (20-30 μm), isodiamétricas (Fig. 18a, p.79), com citoplasma denso com grande número de organelas, conforme determinado por Yeung, (1995). O núcleo grande, caracterizado pela forte reação ao corante carmin acético, indicando também grandes quantidades de material protéico que, segundo Durzan (1988), são representados pelas nucleoproteínas e demonstrando alta capacidade de divisão celular (Fig. 18b). Estas células apresentavam também acúmulo de grãos de amido (Fig. 18c) e presença de corpos lipídicos (Fig. 18d).

Canhoto & Cruz (1996b) observaram que uma densa camada de células meristemáticas, originadas da região cotiledonar após duas semanas em meio basal com 2,4-D, apresentavam características típicas de células embriogênicas, sendo pequenas, isodiamétricas, apresentando citoplasma denso, núcleo central proeminente com pequenos grãos de amido e vacúolos pequenos. Alemanno et al. (1996) verificaram que as células de tecidos florais de cacau apresentavam citoplasma denso, núcleo grande e grande número de nucléolos. Em *Anthurium andraeanum*, Matsumoto et al. (1996) verificaram que as células do mesófilo foliar, das quais originavam os ES, também apresentavam citoplasma denso, presença de grãos de amido e núcleo proeminente.

A acumulação de lipídios nas linhagens embriogênicas pode ser observada em estádios precoces do desenvolvimento de ES (Tulecke, 1987). De forma similar às proteínas os lipídios são acumulados em organelas, no retículo endoplasmático e nas mitocôndrias (Salisbury & Ross, 1994). Estes processos ocorrem antes e durante a maturação e desenvolvimento do

embrião o que freqüentemente coincide com a síntese de proteínas de reservas (Merkle et al., 1995). Estudos histológicos e histoquímicos realizados a partir de cotilédones excisados de EZ de *F. sellowiana* cultivados em meio de cultura, revelaram a presença de corpos protéicos, lipídicos e acúmulo de amido (Canhoto e Cruz, 1996b). Este último foi encontrado em células meristemáticas, proliferadas a partir de células periféricas da superfície adaxial do cotilédone. Da mesma forma à embriogênese zigótica e somática de cacau, verificou-se que ambos apresentam o acúmulo de substâncias de reservas em amido e proteínas e que diferem somente na intensidade menor observadas nos ES (Alemanno et al., 1997).

Com sucessivos sub-cultivos (> 5 vezes) em suspensões celulares, observou-se a perda da capacidade de regeneração celular e pela maior quantidade de células coradas com Azul de Evans (dado não mostrado). Estas células caracterizam-se por uma baixa capacidade embriogênica. Estes resultados sugerem que as culturas devem necessariamente passar por períodos alternados de cultivo líquido e geleificado, como já foi citado anteriormente, e estrategicamente voltar a proporcionar a embriogênese repetitiva, sincrônica e de alta freqüência na produção de ES (Merkle, 1995; Merkle et al., 1995).

No presente trabalho, a evolução da fase de maturação dos ES parece coincidir com o início do processo de organização de estruturas, observadas pelo aglomerado de células e fortemente coradas com carmim acético (Fig. 18e), que se condensam em estruturas maciças característico de ES pré-globulares e globulares de forma repetitiva (Fig.18f), conforme foram relatados por Smith & Krikorian (1989 e 1990)

5.4. Conversão de Embriões Somáticos

Ensaio 1 - Um dos fatores determinantes pelas baixas taxas de conversão dos ES verificados neste experimento, refere-se ao tempo de cultivo na presença em 2,4-D. A permanência dos ES neste fitorregulador por longos períodos (maior 13 semanas) diminuiu a taxa de conversão e aumentou o número de ES anormais, tais como, ES fusionados, cotilédones bifurcados, intumescidos e de coloração branco opaca (Fig. 13a-CT, Fig. 13e-CTT). A análise da variância revelou a existência de diferenças significativas ($P < 0,01$ e $P < 0,05$), para as diferentes fontes de citocininas e níveis de GA_3 utilizados, respectivamente (Tabela 14, p.92). No entanto, não revelaram diferenças significativas para os parâmetros emissão da radícula, com as diferentes citocininas utilizadas e para o parâmetro sem resposta, com o acréscimo de GA_3 ao meio de cultura basal. Os CV(%) revelaram variações maiores em alguns parâmetros, indicando que o controle experimental não foi adequado (Tabela 14). Este fator ocorreu principalmente quando o tempo de cultivo dos ES na presença de 2,4-D, foi maior que quinze semanas

Conforme se observa na Tabela 15, p.93, as maiores taxas de conversão de ES em plântulas (14,7 %) foi obtida em meio de cultura LPm contendo BAP (0,5 μ M), diferindo (SNK a 5 %) dos demais tratamentos para o fator citocinina. A adição de GA₃ (0,1 μ M) proporcionou taxas maiores (9,2 %) e também diferiu para este mesmo teste, quando comparada da ausência deste fitorregulador. Embora a interação citocinina versus GA₃ não foi significativa, pode-se observar nesta mesma Tabela, que o emprego do BAP (0,5 μ M) combinado com GA₃ (0,1 μ M), revelou a melhor taxa de conversão (19,0 %). Plântulas com a emissão do sistema radicular foram observados após uma semana da transferência para meios de germinação (Fig. 19a, p.80) e abertura dos cotilédones em duas semanas esta transferência (Fig. 19b).

Ensaio 2 - Neste ensaio, a análise da variância revelou diferença significativa ($P < 0,01$) somente para o parâmetro emissão da radícula (Tabela 16, p.94). Os valores dos CV (%), indicam que o padrão de resposta foi semelhante ao apresentado no ensaios 1 e a origem dos explante também foi determinante pelas baixas taxas de conversão. Apresentou porém, um incremento médio de 10% na taxa de conversão em plântula, em resposta à utilização do meio de cultura adicionado da melhor combinação de fitorreguladores revelado no ensaio 1.

Embora sem diferenças estatísticas, pode-se observar na Tabela 17, p.95, que a taxa mais alta de conversão em plântulas (21,8 %) foi proporcionada pela adição de BAP (0,5 μ M) combinado com GA₃ (0,1 μ M). No entanto, para o parâmetro emissão da radícula, a maior taxa de ES com radícula (9 %) foi proporcionado pela adição de BAP (0,25 μ M), diferindo estatisticamente (teste SNK a 5 %) entre os demais níveis de BAP. Desta forma, como era de se esperar, níveis mais elevados de BAP prejudicam a emissão do sistema radicular (Tabela 17).

Em ambos os ensaios quando os embriões somáticos na fase pré-cotiledonar, foram inoculados em meio de cultura e adicionado de BAP e GA₃, favoreceu a conversão dos ES e resultou em plântulas completas em 15 dias depois da inoculação (Fig. 12; Fig. 19b). A transferência para meios de cultura basal livre de fitorreguladores promoveu o desenvolvimento e alongamento epicótilo-radícula. Estas plantas apresentavam-se aptas para serem transferidas para sala de fitotron e aclimatização em 15 a 20 dias depois da repicagem para o meio de cultura livre de fitorreguladores (Fig. 19e). Cruz et al. (1990) apontaram que a conversão de embriões somáticos pode ser obtida após a transferência de embriões maduros para meio basal MS adicionado de GA₃ e Kin.

Em *Daucus carota* Nickle & Yeung (1993) observaram um aumento significativo na taxa de conversão de ES na presença de 50 μ M de ABA. No entanto, o início da formação de ES de pimentão foi obtida em meios de cultura contendo 6 g/l de prolina e 10 mM de amônio. Quando transferidos para meios de cultura contendo ½ MS com a adição de 1,89 μ M de ABA,

proporcionou as maiores taxas de maturação e posteriormente a conversão dos embriões de pimentão (Buyukalaca & Mavituna, 1996). Em *Larix accidentalis*, os melhores resultados na maturação dos ES foram observados em meios de cultura contendo 0,025 μM de ABA por uma a duas semanas e, posteriormente, para meios isentos de fitorreguladores (Thompson & von Aderkas, 1992). Estes autores observaram também que as concentrações utilizadas e os tempos de exposição ao ABA variaram conforme o genótipo utilizado. Muralidharan & Mascarenhas (1995) observaram também que o aumento dos níveis de ABA, promoveu uma redução no crescimento e no número total de ES em *Eucalyptus*. No entanto, segundo estes autores, meios de cultura isentos de ABA proporcionam os melhores resultados na diferenciação dos ES nesta espécie.

5.5. Sementes Sintéticas

Embriões somáticos nos estádios de torpedo à torpedo tardio ou pré-cotiledonar, quando pré-germinados (Fig. 19a), encapsulados em endosperma artificial e estimulados para a abertura da cápsula, permitem a obtenção de plântulas completas (Fig. 19c). Da mesma forma ocorrida na conversão dos ES, ocorreram também baixas taxas de respostas para obter ES pré-germinados, devido ao cultivo prolongado em 2,4-D. Portanto, as unidades experimentais, para a produção de sementes sintéticas, foram constituídas por 10 cápsulas cada uma. Este número foi baixo, devido a grande variabilidade existente e para obter uma representatividade da população.

Conforme se observa na Tabela 18, p.96, para o fator abertura de cápsulas a análise da variância exibiu diferenças significativas ($P < 0,01$) nos parâmetros plântulas completas e emissão da radícula. O emprego de endosperma artificial não foi significativo para a conversão em plântulas completas, mas apresentou diferenças significativas ($P < 0,01$) em promover a emissão da radícula e para as taxas de cápsulas contaminadas. Na interação entre endosperma artificial versus abertura de cápsulas, esta análise revelou diferenças significativas para os parâmetros: plântulas completas ($P < 0,05$), emissão radicular ($P < 0,01$) e cotilédones abertos ($P < 0,05$). Os CV (%) revelam a existência de elevada variabilidade e problemas no controle experimental (Tabela 18). Estes fatores, provavelmente foram influenciados pela natureza e origem dos ES, tais como, desuniformidade dos ES e cultivo prolongado dos ES na presença de 2,4-D.

A maior taxa de conversão em plântulas completas (51,2 %) foi obtida com a composição de endosperma artificial (EA 3) contendo: $\frac{1}{2}$ LPm, vitaminas de Morel, CH (500 mg/l), Kin (0,5 μM) e GA₃ (0,05 μM) e associado ao KNO₃ (200 mM) para permitir a abertura das cápsulas (Tabela 19, p.97). Esta taxa, contudo, não diferiu segundo teste SNK (5 %) da

taxa de conversão (36,4 %) proporcionada somente pela composição com os fitorreguladores Kin (0,5 μM) e GA₃ (0,05 μM), associada também com o KNO₃ (Tabela 19).

O KNO₃ (200 mM) por 30 min, possibilitou a descomplexação do Ca⁺⁺ e a abertura de cápsulas (Fig. 19c), para permitir a germinação dos ES, diferindo do tratamento testemunha (H₂O). Isto resultou em plântulas completas duas semanas após a transferência para sala de germinação (Tabela 19). No entanto, no tratamento testemunha (H₂O), as cápsulas se mantiveram numa consistência firme, favorecendo a emissão da radícula para fora da cápsula (Fig. 19d). Muralidharan & Mascarenhas (1995) também observaram a emissão da radícula dos ES de *Eucalyptus* para fora da cápsula, quando as mesmas foram transferidas para germinação sem a utilização de KNO₃. Este tratamento, associado também à composição AE 3, promoveu a maior taxa de ES com a emissão da radícula (65,7 %), mas não diferiu, segundo teste SNK (5 %), do tratamento testemunha com a composição EA 2 (51,9 %), ou seja, composição isenta dos sais de LPM e vitaminas de Morel (Tabela 19).

A presença de contaminantes junto às cápsulas, seja por fungos e/ou bactérias, parece estar relacionada com o aumento do teor nutritivo da composição do endosperma artificial. Isto sugere a utilização de agentes antifúngicos e antibacterianos junto na elaboração das cápsulas, conforme sugerido (Redenbaugh et al., 1987 e Gray & Purohit, 1991). Conforme se observa na Tabela 19, os tratamentos EA 4 (72,2 %) e EA 3 (63,5 %) revelaram as maiores taxas de contaminação e não diferiram estatisticamente entre si, segundo teste SNK (5 %). Contudo, ambos diferiram dos resultados obtidos no tratamento EA 1 (16,9 %) e EA2 (21,6 %), os quais não apresentaram os sais de LPM e vitaminas de Morel.

Na tentativa de proporcionar melhorias na elaboração, germinação e conversão de ES em plântulas completas, inúmeros compostos e técnicas têm sido empregados. Na elaboração de um endosperma artificial, entre os mais utilizados estão os nutrientes salinos, fontes de carbono, principalmente a sacarose e outras hexoses e várias fontes de amido (Redenbaugh et al., 1986, 1987, 1988). Na tentativa de reduzir os níveis internos de inibidores, o armazenamento das sementes sintéticas de *Pinus taeda* a 4°C por 4 meses no escuro foi utilizado por Gupta & Durzan (1987). Armazenamento de sementes sintéticas de *Eucalyptus* a 4°C por 1 a 7 dias promoveu um declínio nas taxas de germinação de 38 % para 28 %, respectivamente (Muralidharan & Mascarenhas, 1995). Onishi et al. (1994), descreveram um protocolo para encapsular embriões somáticos em sistemas de "scale-up", através da utilização de aparatos de encapsulamento pela utilização de alginato de sódio e elaboração de endosperma artificial contendo sacarose granulada e polímeros sintéticos. Estes autores sugeriram o uso do KNO₃ como agente de abertura das cápsulas.

Para a aplicação comercial, há a necessidade de se ter uma semente sintética que possibilite a germinação e o desenvolvimento de plântulas em taxas compatíveis com as

obtidas com as sementes verdadeiras. Portanto, esta técnica requer a elucidação e definição dos processos da embriogênese somática, identificando os pontos de controle e estabelecendo a rota e obtenção, conforme se observa na Fig. 12, para possibilitar a sincronização dos estádios de desenvolvimento e a posterior produção da semente sintética com todos os coadjuvantes necessários para possibilitar a formação de uma planta completa (Redenbaugh et al., 1988; Redenbaugh, 1990; Gray & Purohit, 1991).

5.6. Aclimatização de Plântulas

Plântulas completas originadas da maturação e conversão de ES e da germinação das sementes sintéticas foram obtidas e aclimatizadas em fitotron. Depois de 30 dias, estas plântulas foram transferidas para túnel de nebulização com irrigação intermitente sob sombrite (Fig. 19f).

6. SÍNTESE DOS PRINCIPAIS RESULTADOS

Os principais resultados obtidos no presente trabalho podem ser assim resumidos:

1. A maior percentagem de indução da ES e o maior número de ES ocorreram nos acessos 101 e 50-4 e o acesso 53B-7 revelou os menores valores de indução e produção de ES.

2. O melhor processo de indução e expressão da embriogênese somática de altas freqüência na *Feijoa sellowiana* foi obtida com o meio de cultura basal LPm, suplementado com 2,4-D (10 - 20 μ M) e com, no mínimo, 4 mM de uma fonte de aminoácidos (Gln, Asn ou Arg).

3. A indução desta rota morfogenética e a produção de ES de alta freqüência pode ser obtida com um pulso de duas semanas em meio de cultura LPm adicionado de 2,4-D (20 μ M), Gln (4 mM).

4. Cinco semanas após a inoculação observaram-se valores médios baixos de ES e estes encontravam-se principalmente nos estádios globulares e cordiformes. Aproximadamente dez semanas após a inoculação observou-se que mais de 90 % destes ES encontravam-se nos estádios de pré-cotiledonar e cotiledonar, sendo este o período de maior expressão da embriogênese somática.

5. As maiores intensidades de respostas embriogenéticas dos EZ estão associadas com os frutos cujas sementes encontram-se em maturação fisiológica, o que ocorre num período de aproximadamente 120 dias após a antese.

6. Sementes armazenadas a 4 °C, mantiveram alto potencial de indução (80 %) e produção de ES (59,6 ES) por um período de até 12 meses.

7. Estudos histológicos demonstraram que os embriões somáticos originaram-se diretamente sobre os tecidos cotiledonares dos EZ, aspecto este visualizado aos dezesseis dias após a inoculação dos explantes em meio de cultura.

8. O estabelecimento e multiplicação de linhagens celulares embriogenéticas foram otimizados em meio basal LPm geleificado adicionado de 2,4-D (2 μ M) e 2-iP (1 μ M). Neste caso, observou-se a formação de novas estruturas pró-embriogênicas, configurando processos de embriogênese repetitiva. Concentrações de 3 e 5 μ M de 2,4-D induziram intensas proliferações celulares, porém as massas celulares apresentavam características opacas de coloração amarelada, de baixa friabilidade, típica de células não embriogênicas, enquanto que níveis de 1 μ M de 2,4-D ou meios de cultura isentos desta auxina, permitiram a progressão para os estádios de maturação dos ES.

9. A dinâmica de crescimento das suspensões celulares revelou um incremento de 21,7

vezes após 50 dias em meio de cultura LPm, contendo 2,4-D ($1\mu\text{M}$) e 2-iP ($1\mu\text{M}$). Inóculos contendo 5 ml da cultura anterior, proporcionaram curvas de crescimento semelhantes aos padrões representados pelas outras células vegetais. A alternância de repicagens das linhagens celulares em meio basal LPm líquido e geleificado foi fundamental para a multiplicação destas linhagens em suspensão.

10. Linhagens celulares mantidas em plaqueamento e submetidas à reduções gradativas nos níveis de 2,4-D foram estimuladas ao desenvolvimento e maturação dos ES e a produção de ES de alta frequência. Porém, linhagens celulares mantidas em meio basal LPm líquido, isento de fitorreguladores, repicadas para o mesmo meio basal geleificado, suplementado com 2-iP ($5\mu\text{M}$) e posteriormente repicadas para o mesmo meio basal, adicionado de ABA ($10\mu\text{M}$) ou PEG (10mM), foram induzidas à progressão para estádios embriogênicos e a maturação dos ES em um modelo de baixa frequência.

11. As melhores taxas de conversão de ES em plântulas foram obtidas em meio basal LPm contendo BAP ($0,25$ ou $0,5\mu\text{M}$) e/ou combinado com GA_3 ($0,1\mu\text{M}$).

12. Sementes sintéticas com endosperma artificial contendo meio basal $\frac{1}{2}$ LPm, vitaminas de Morel, CH (500mg/l), Kin ($0,5\mu\text{M}$) e GA_3 ($0,05\mu\text{M}$) e submetidas à descomplexação do Ca^{++} com KNO_3 (200mM) por 30 min resultaram na conversão de 51,2 % de plântulas.

13. Estudos histoquímicos demonstraram a evolução dos processos morfogênicos *in vitro*, e a caracterização de tipos celulares embriogênicos e não embriogênicos.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos no presente trabalho abrem a perspectiva de serem aprofundados alguns aspectos básicos e aplicados, relacionados com a embriogênese somática de *F. sellowiana*. Entre as perspectivas interessantes para a continuidade destes estudos pode-se citar:

1. Aprofundamento dos estudos relacionados com os efeitos da presença contínua e da retirada do 2,4-D do meio de cultivo na indução, desenvolvimento e produção de ES alta qualidade, com otimização nas taxas de conversão.

2. Avaliação dos efeitos da Gln, de fontes adicionais íons NH_4^+ , assim como os efeitos da prolina nas fases de indução, manutenção, multiplicação e maturação dos ES. O aminoácido prolina, têm efeitos conhecidos na osmoregulação e na possível síntese de proteínas de reserva dos ES.

3. Determinação dos índices mitóticos na dinâmica de crescimento celular

4. Identificação do número de subcultivos alternados entre meio sólido e meio líquido relacionados com a manutenção da capacidade regenerativa e das características embriogênicas.

5. Avaliação da seqüência dos subcultivos com os respectivos fitoreguladores, osmoreguladores e fontes de aminoácidos, para aumentar as taxas de maturação das linhagens celulares e principalmente a sincronização dos ES.

6. Testar pulsos ou balanços de auxinas/citocininas associados ao GA_3 para favorecer a conversão dos ES e permitir a produção de sementes sintéticas com altas taxas de regeneração em plantas completas.

7. Partindo do meio basal já definido, testar os efeitos sobre outras fontes de explantes originados de tecidos somáticos embrionários e juvenis na indução da embriogênese somática.

8. Certificar-se dos aspectos relacionados com a qualidade dos ES e da fidelidade clonal por meio de: a) estudos comparativos sobre os padrões de proteínas de reservas dos EZ e ES, associados à sua capacidade de produção de plantas de alto vigor. b) avaliar a fidelidade clonal das plantas regeneradas, por meio de marcadores bioquímicos e molecular, tais como isoenzimas, RFLP ou RAPD.

9. Aprofundar os estudos histológicos e histoquímicos.

10. Estudar os aspectos relacionados com a automatização do processo da embriogênese somática, referente aos ciclos repetitivos e de maturação, demonstrado na Fig. 1 e na implementação da tecnologia de produção de sementes sintéticas, com viabilidade elevada na conservação, transporte e na regeneração de plântulas

8. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho contribuíram para o avanço do conhecimento básico no controle da morfogênese *in vitro* da *Feijoa sellowiana*. Foram elucidados alguns fatores determinantes da competência celular para a indução e expressão da embriogênese somática, permitindo detectar pontos de controle nesta rota morfogenética e a definição dos pontos básicos do protocolo nos processos de indução e da produção dos ES de alta frequência. No que se refere à obtenção de linhagens celulares foram estabelecidas algumas estratégias mais eficientes quanto à indução, estabelecimento de ciclos repetitivos de divisão celular, multiplicação das culturas em suspensão e a caracterização dos tipos celulares. Nas fases finais deste processo, foram identificados fatores associados à maturação e conversão dos ES e à produção de sementes sintéticas.

Os impactos do presente trabalho podem ser considerados sob dois prismas. O primeiro deles refere-se ao estabelecimento de uma linha de pesquisa relacionada com o estabelecimento de um sistema referência para a embriogênese somática em espécies perenes de dicotiledôneas. Foram identificados e elucidados, em parte, pontos de controle da indução e desenvolvimento embrionário, considerando-se como referência o desenvolvimento dos embriões zigóticos. O segundo aspecto relaciona-se com o avanço no estabelecimento de um protocolo regenerativo, baseado na embriogênese somática, para a micropropagação massal desta espécie, na tentativa de superar as limitações impostas pela propagação vegetativa convencional.

FIGURAS

e

TABELAS

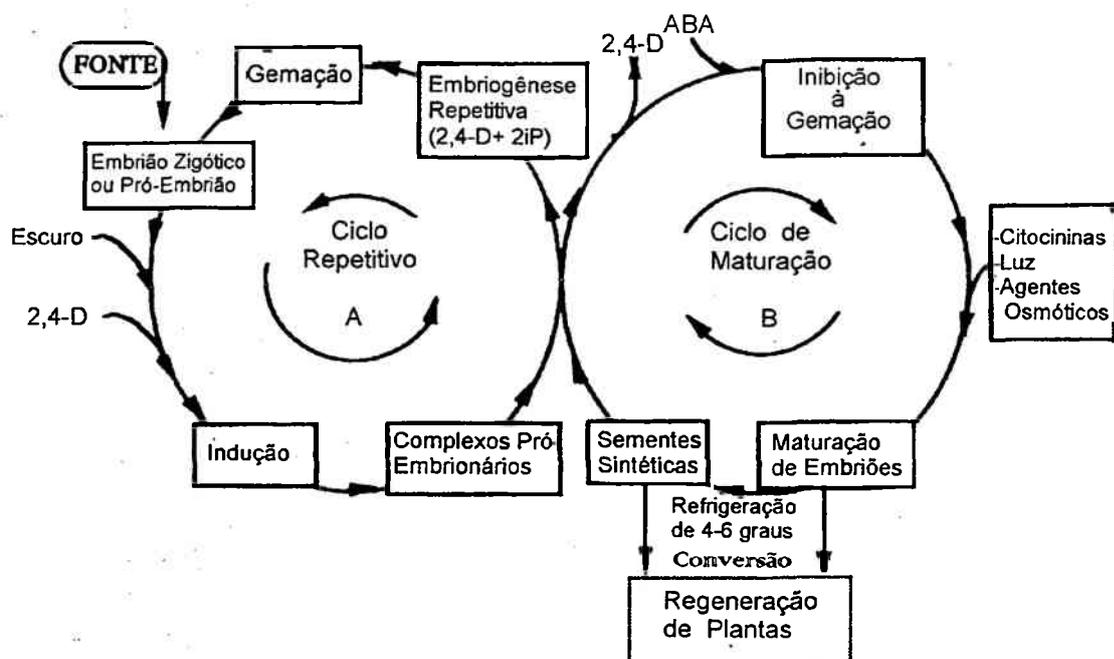


Fig. 1. Processo de dois ciclos para a indução e modulação da embriogênese somática. adaptado de Durzan (1988).

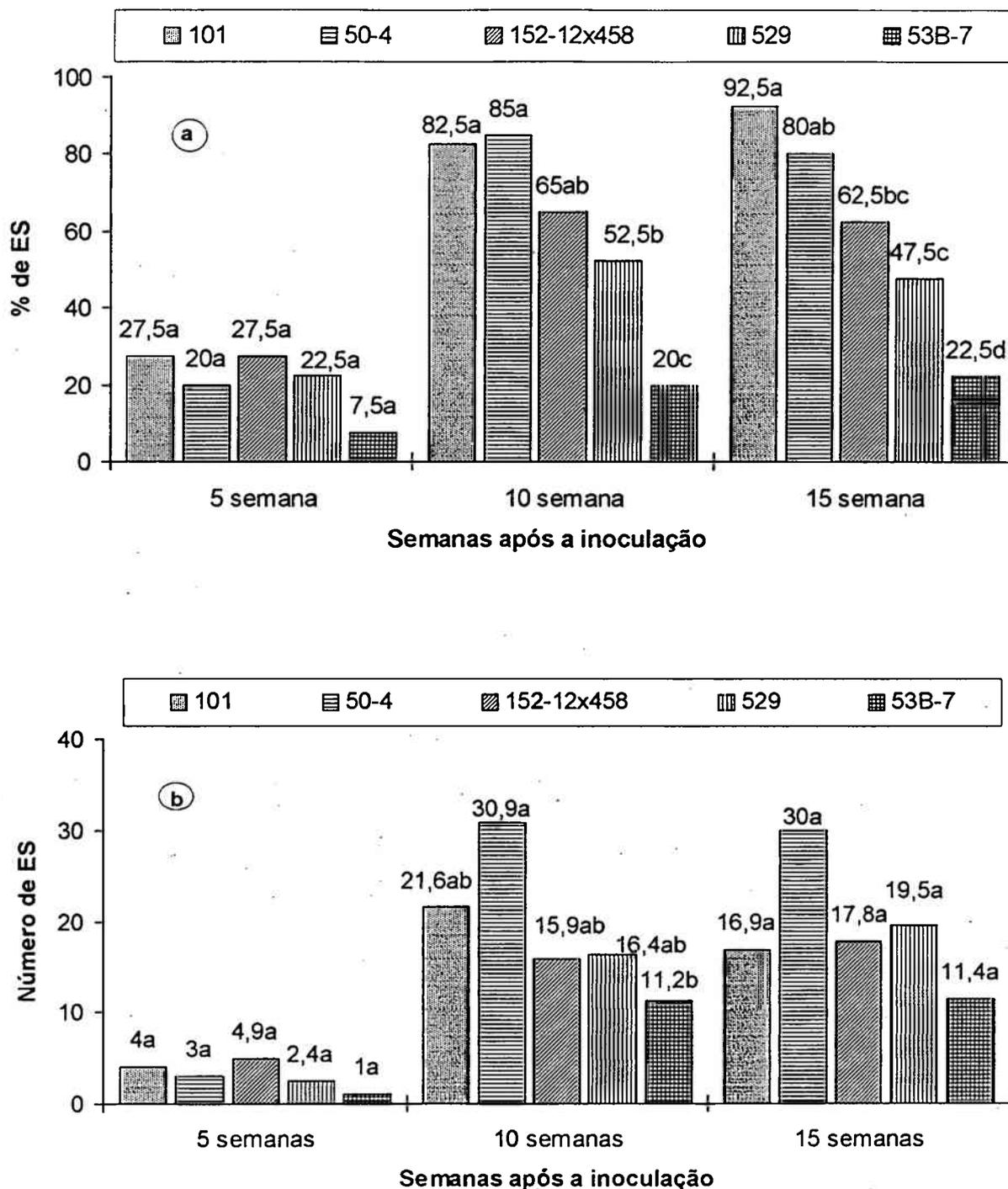
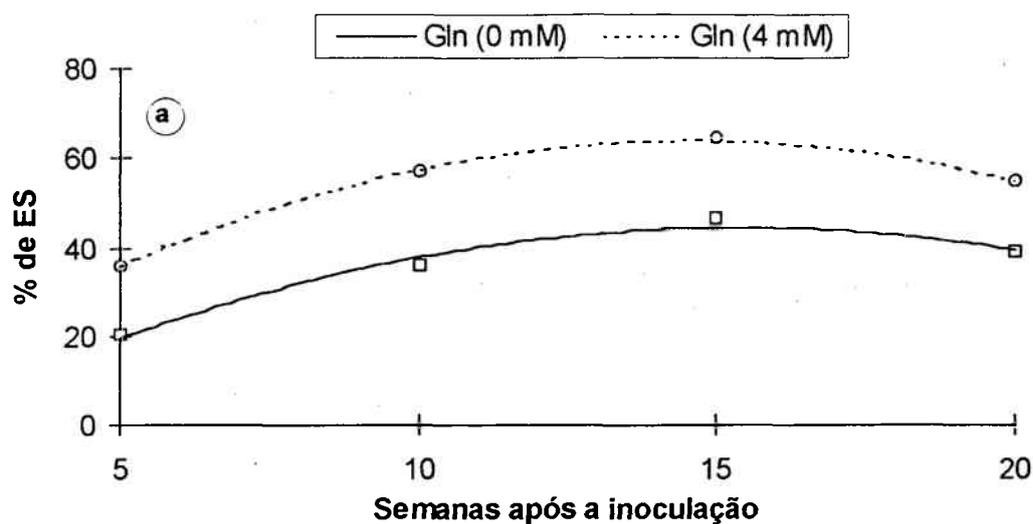
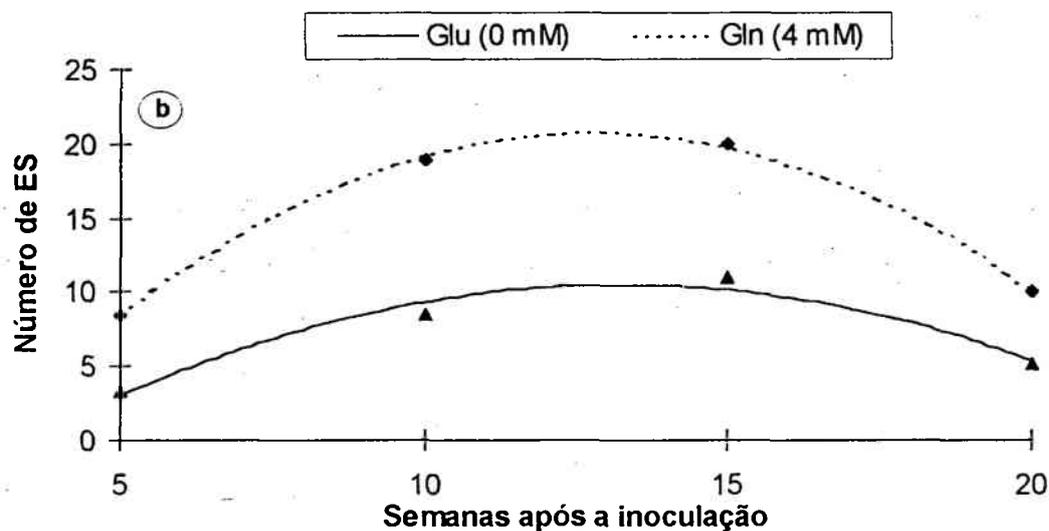


Fig. 2. a) Percentagem de explantes com embriões somáticos *(% de ES) e b) número de embriões somáticos por explante *(número de ES) a partir de EZ de em cinco acesso de *Feijoa sellowiana* Berg. cultivados em meio de cultura LPM (von Arnold & Eriksson, 1981), adicionado de 2,4-D (20 μ M), cinco, dez e quinze semanas após a inoculação. * Médias de 4 repetições; letras indicam valores que diferem no período de avaliação, para o teste SNK (5%), CCA/UFSC, 1998.



$$Y_{(\text{Gln } 4 \text{ mM})} = -0,306x^2 + 8,922x - 1,15 \quad r^2 = 0,9983$$

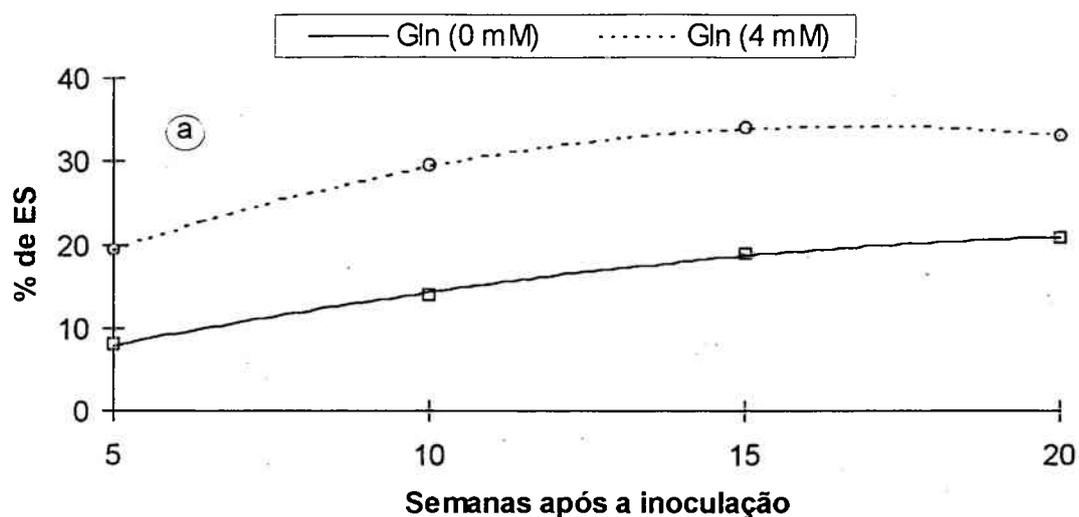
$$Y_{(\text{Gln } 0 \text{ mM})} = -0,231x^2 + 7,097x - 10,125 \quad r^2 = 0,9718$$



$$Y_{(\text{Gln } 4 \text{ mM})} = -0,204x^2 + 5,212x - 12,55 \quad r^2 = 0,9985$$

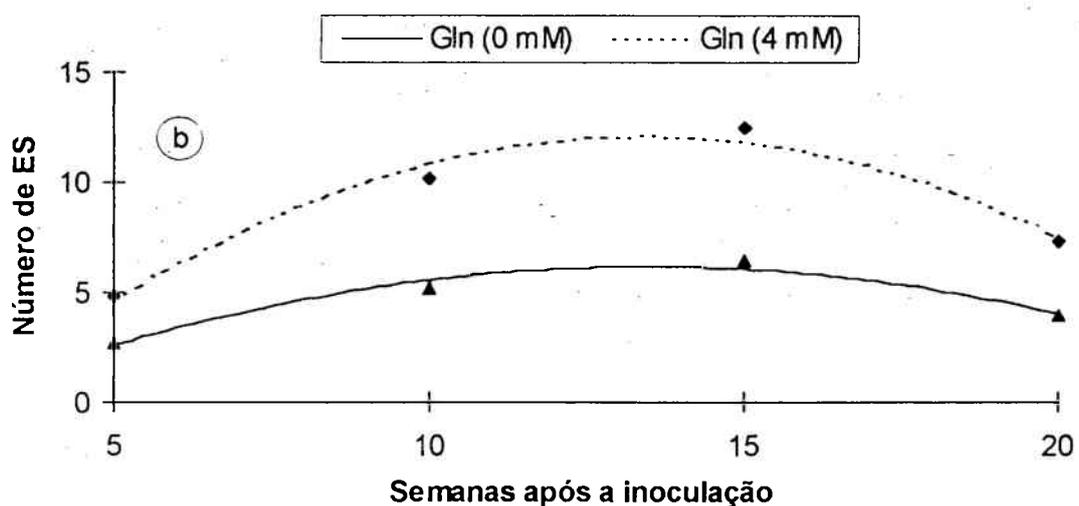
$$Y_{(\text{Gln } 0 \text{ mM})} = -0,111x^2 + 2,933x - 8,875 \quad r^2 = 0,9543$$

Fig. 3. a) Percentagem de indução a embriogênese somática *(% de ES) e b) Número de embriões somáticos por explante *(número de ES) em função do tempo a partir de embriões zigóticos do acesso 101 de *Feijoa sellowiana* Berg, em resposta à Gln (0 e 4mM), adicionada ao meio de cultura LPm (von Arnold & Eriksson, 1981), MS (Murashige & Skoog, 1962) e WPM (Lloyd & McCown, 1980) suplementado com 2,4-D (10 e 20 μ M). *Médias de 4 repetições, CCA/UFSC, 1998.



$$Y_{(\text{Gln } 4 \text{ mM})} = -0,103x^2 + 3,477x + 4,775 \quad r^2 = 0,9989$$

$$Y_{(\text{Gln } 0 \text{ mM})} = -0,046x^2 + 2,026x - 1,15 \quad r^2 = 0,9943$$



$$Y_{(\text{Gln } 4 \text{ mM})} = -0,106x^2 + 2,846x - 7 \quad r^2 = 0,9714$$

$$Y_{(\text{Gln } 0 \text{ mM})} = -0,05x^2 + 1,346x - 2,9 \quad r^2 = 0,9625$$

Fig. 4. a) Percentagem de explantes com embriões somáticos *(% de ES) e b) Número de embriões somáticos por explante *(número de ES) em função do tempo, a partir de EZ do acesso 101 de *Feijoa sellowiana* Berg, em resposta à Gln (0 e 4 mM), adicionada à formulação salina LPm (von Arnold & Eriksson, 1981) modificada para diferentes proporções de $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$. * Médias de 4 repetições, CCA/UFSC, 1998.

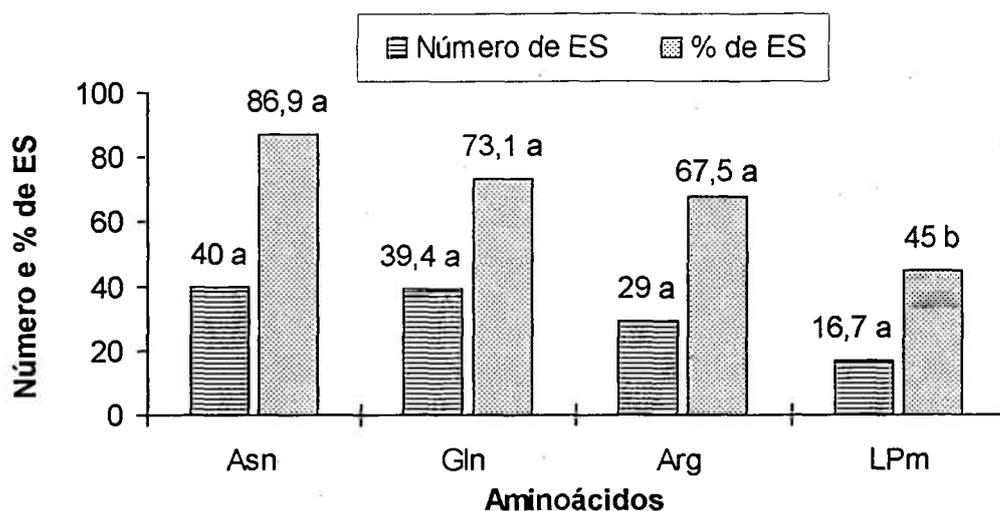
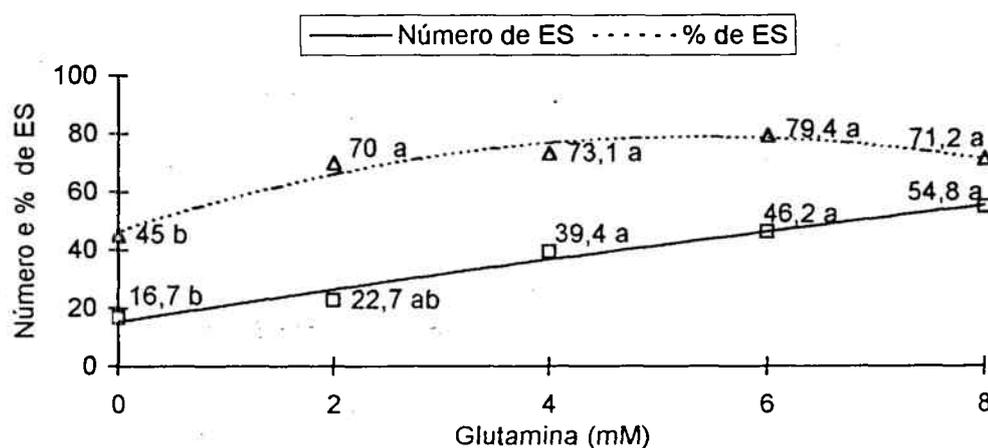


Fig. 5. Percentagem de indução a embriogênese somática *(% de ES) e número de embriões somáticos por explantes *(número de ES) a partir de EZ do acesso 101 de *Feijoa sellowiana* Berg, em resposta à adição de 4 mM dos aminoácidos Gln, Asn e Arg ao meio de cultura basal LPm (von Arnold & Eriksson, 1981), suplementado com 2,4-D (10 μ M), *Médias de 4 repetições; letras indicam valores que diferem dentro do parâmetro, para o teste SNK (5%), CCA/UFSC, 1998.



$$Y (\text{No.}) = -0,0839x^2 + 5,6564x + 15,349 \quad r^2 = 0,9776$$

$$Y (\%) = -1,1286x^2 + 12,119x + 46,351 \quad r^2 = 0,9547$$

Fig. 6. Percentagem de indução da embriogênese somática *(% de ES) e número de ES por explantes *(número de ES) em função da concentração em mM de Gln, a partir de EZ do acesso 101 de *Feijoa sellowiana* Berg, cultivados em meio de cultura LPm (von Arnold & Eriksson, 1981), adicionado de 2,4-D (10 μ M), * letras indicam valores que diferem dentro do período de avaliação, para o teste SNK (5%); Médias de 4 repetições, CCA/UFSC, 1998.

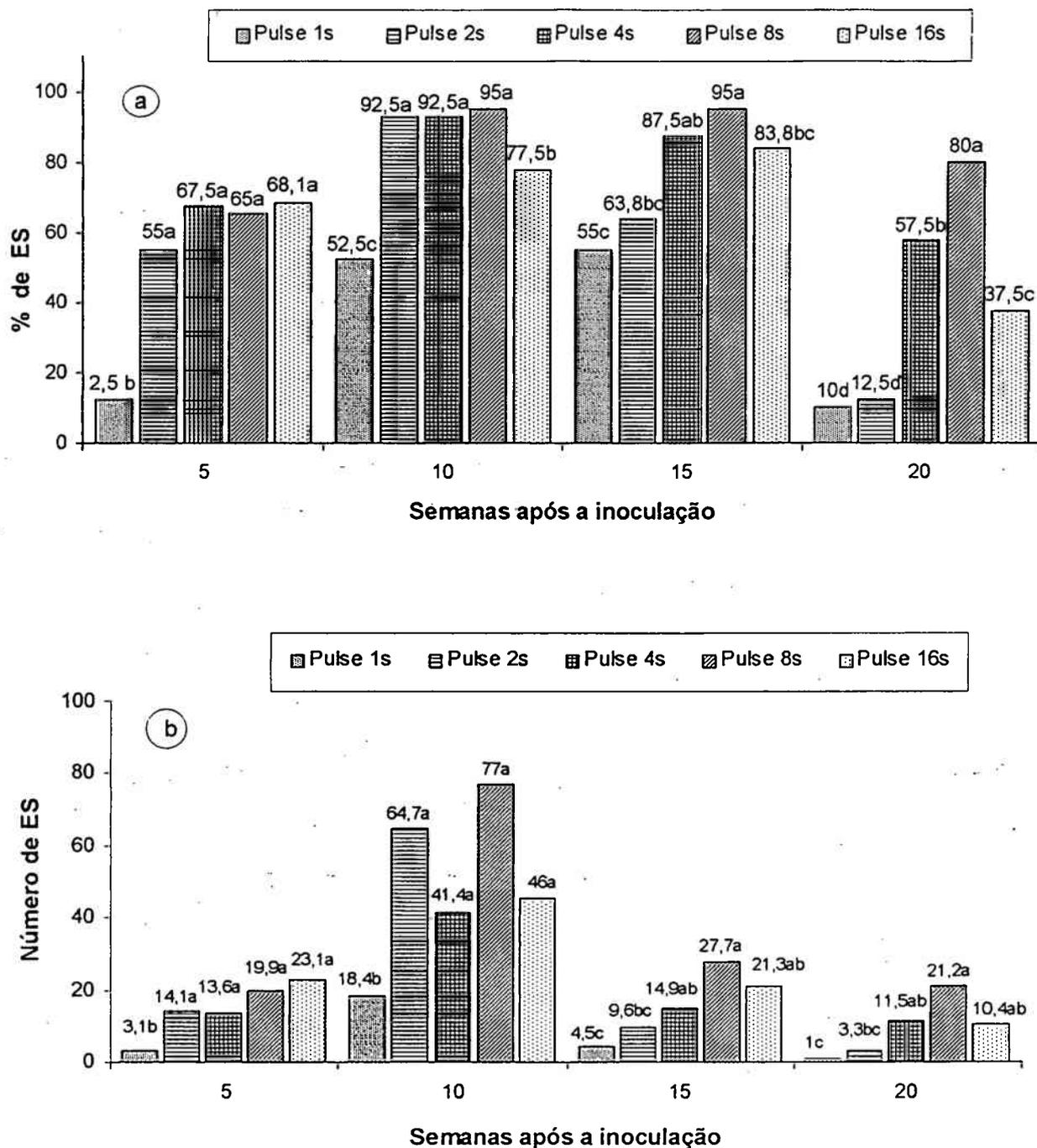


Fig. 7. a) Percentagem de indução da embriogênese somática (% de ES) e b) número de embriões somáticos por explante *(número de ES) a partir de EZ do acesso 101 de *Feijoa sellowiana* Berg, em resposta a pulsos de 1; 2; 4; 8 e 16 semanas em 2,4-D (20 μ M), em meio de cultura basal LPm (von Arnold & Eriksson, 1981) e glutamina (4 mM), aos cinco, dez, quinze e vinte semanas após a inoculação. Médias de 4 repetições; letras indicam valores que diferem dentro do período de avaliação, para o teste SNK (5%); * dados transformados em $(X + 0,5)^{0,5}$, CCA/UFSC, 1998.

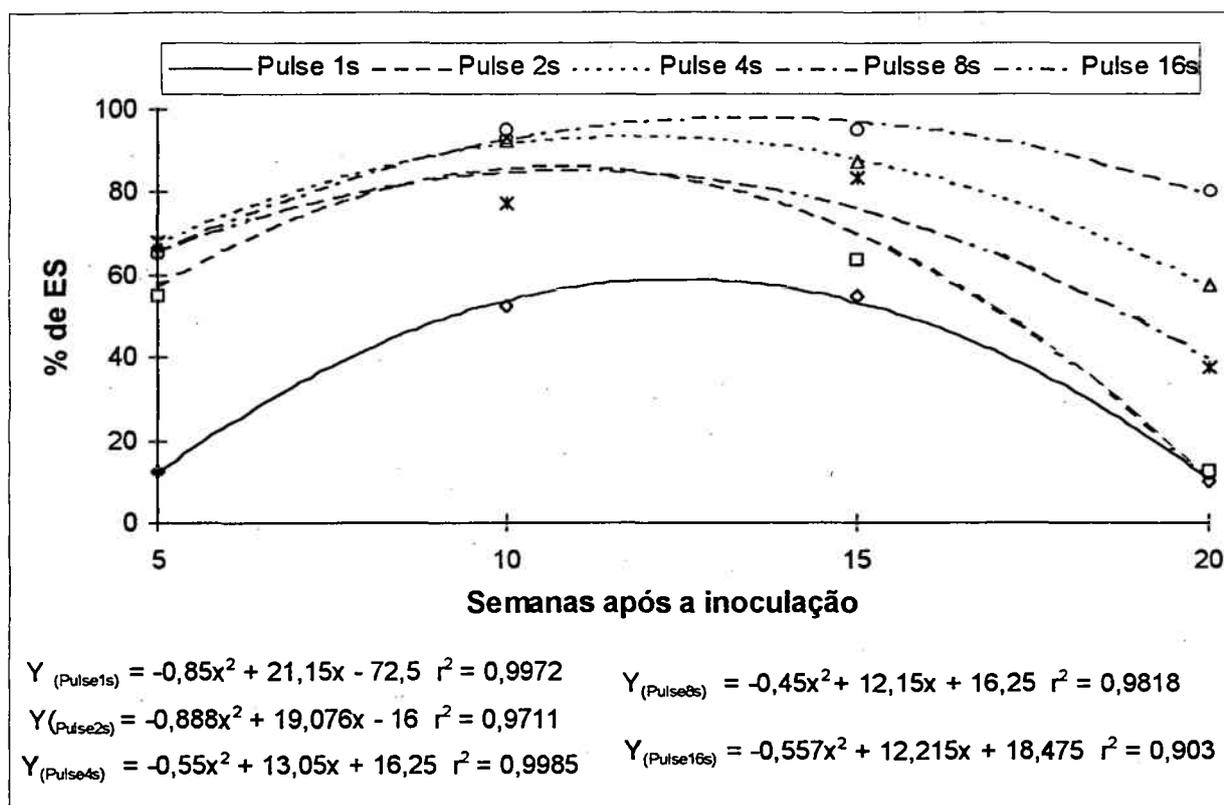


Fig. 8. Evolução da indução da embriogênese somática *(% de ES) em função do tempo, a partir de EZ do acesso 101 de *Feijoa sellowiana* Berg, em resposta a pulsos de 1; 2; 4; 8 e 16 semanas em 2,4-D (20 μ M) em meio de cultura basal LPM (von Arnold & Eriksson, 1981), suplementado com Gln (4 mM), aos cinco, dez, quinze e vinte semanas após a inoculação. *Médias de 4 repetições, CCA/UFSC, 1998.

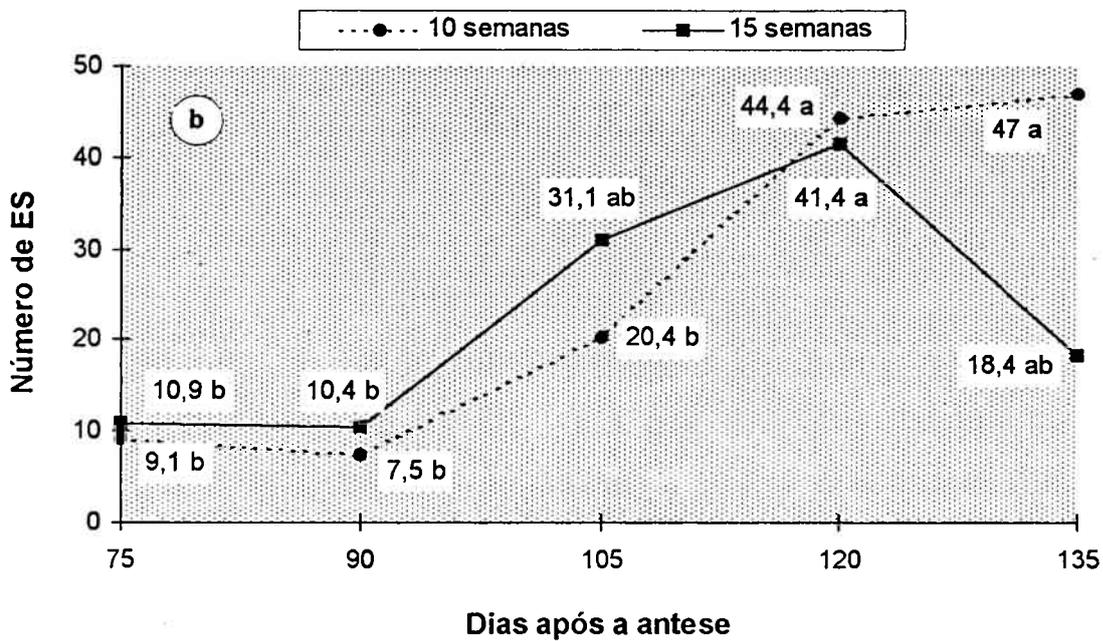
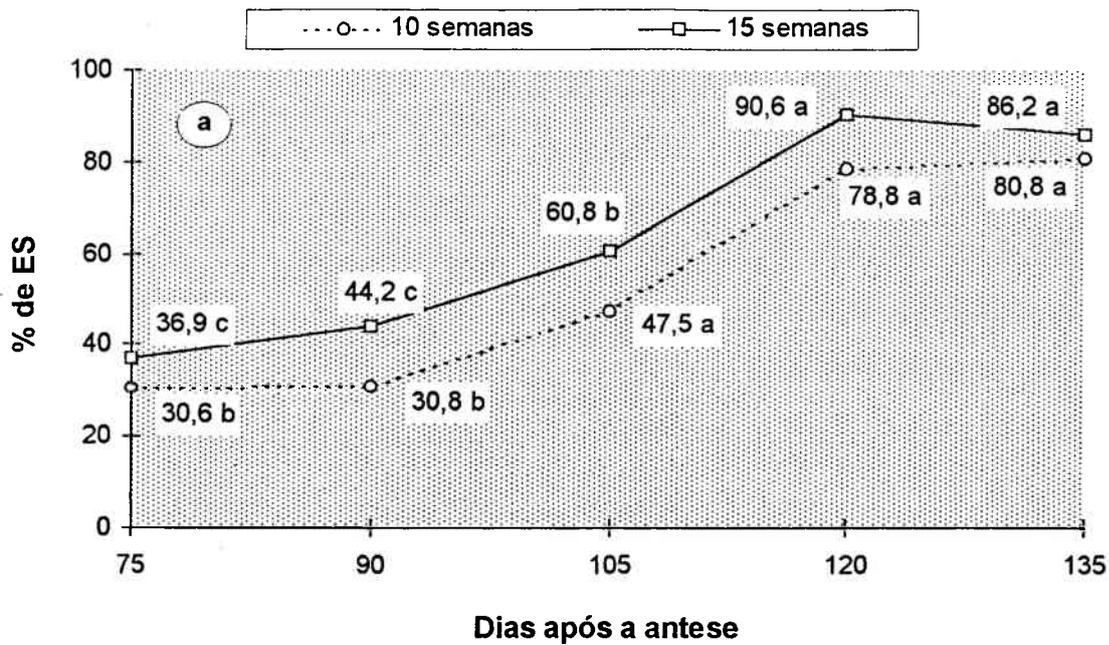
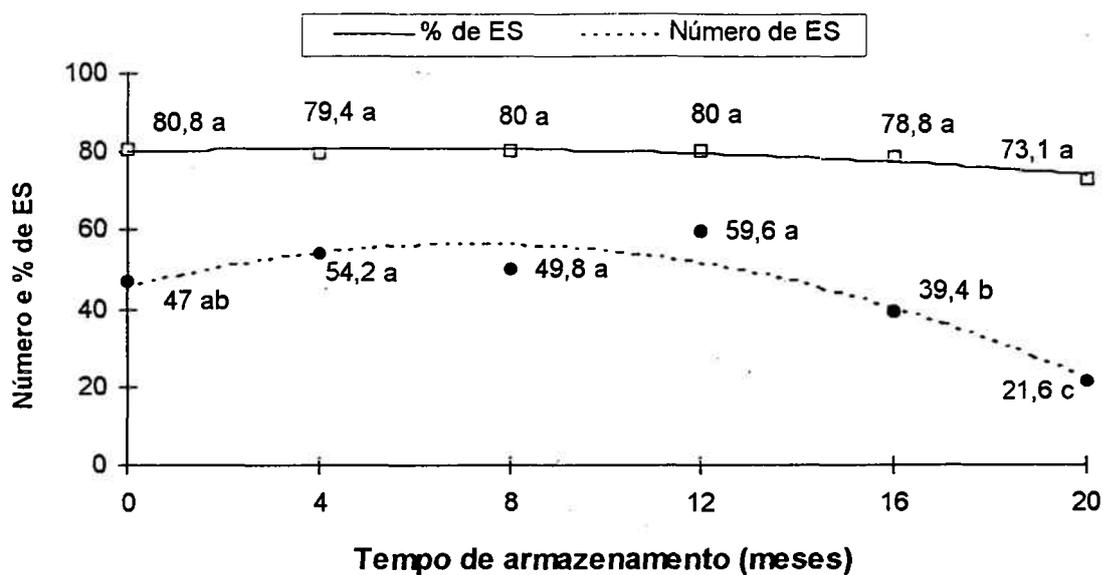


Fig. 9. a) Evolução da porcentagem de embriogênese somática *(% de ES) e b) evolução do número de embriões somáticos por explante *(número de ES) a partir de embriões zigóticos coletados de frutos em diferentes estádios de maturação (dias após a antese), do acesso 101 de *Feijoa sellowiana* Berg, em resposta ao meio de cultura LPm (von Arnold & Eriksson, 1981), adicionado de 2,4-D (20 μ M) e Gln (4 mM), dez e quinze semanas após a inoculação, * letras indicam valores que diferem dentro do período de avaliação, para o teste SNK (5%); Médias de 4 repetições, CCA/UFSC, 1998.



$$Y (\%) = -0,032x^2 + 0,3528x + 79,854 \quad r^2 = 0,8325$$

$$Y (N^{\circ}) = -0,21x^2 + 3,0466x + 45,607 \quad r^2 = 0,8798$$

Fig. 10. Evolução da porcentagem da embriogênese somática *(% de ES) e número de embriões somáticos por explantes *(número de ES) em resposta a diferentes períodos de armazenamento (meses a 4° C) dos embriões zigóticos, do acesso 101 de *Feijoa sellowiana* Berg, em resposta ao meio de cultura LPM (von Arnold & Eriksson, 1981), adicionado de 2,4-D (20µM) e glutamina (4mM), dez semanas após a inoculação, * Médias de 4 repetições, letras indicam valores que diferem para o teste SNK (5%), CCA/UFSC, 1998.

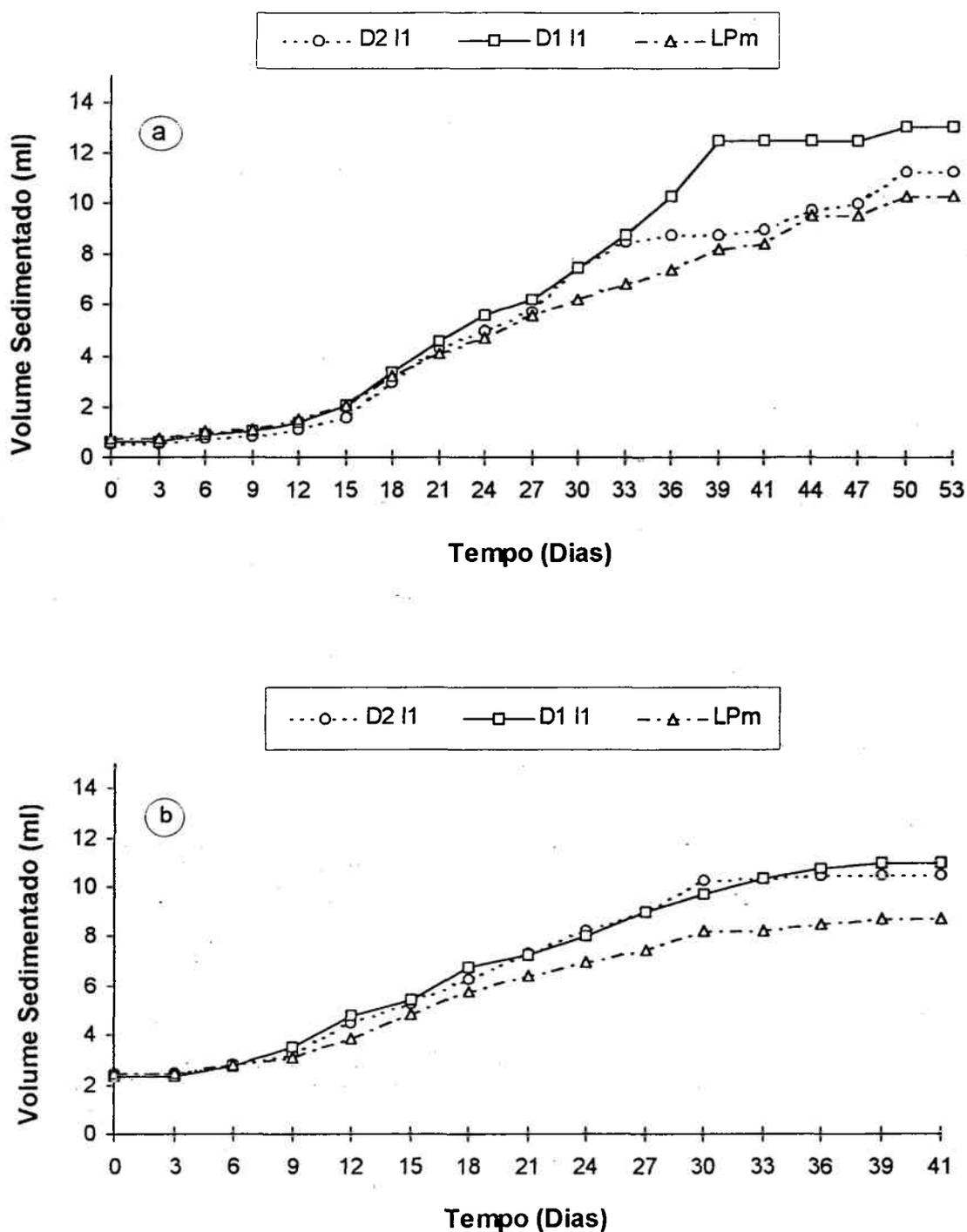


Fig. 11. Curvas de crescimento de linhagens celulares embriogênicas (LCE) * (volume médio sedimentado em função do tempo) do acesso 101 de (*Feijoa sellowiana* Berg), cultivadas em meio de cultura LPm (von Arnold & Eriksson, 1981) adicionado de uma combinação de 2,4-D (D) (1 e 2 μ M), 2iP (I) (1 μ M) e LPm livre de fitorreguladores. a) inóculo de 5 ml de suspensão celular, em cinquenta e três dias de incubação; b) Média de 1,4g de massa celular embriogênica, em quarenta e um dias de incubação. * Média de três repetições, tempo de sedimentação de uma hora, CCA/UFSC, 1998.

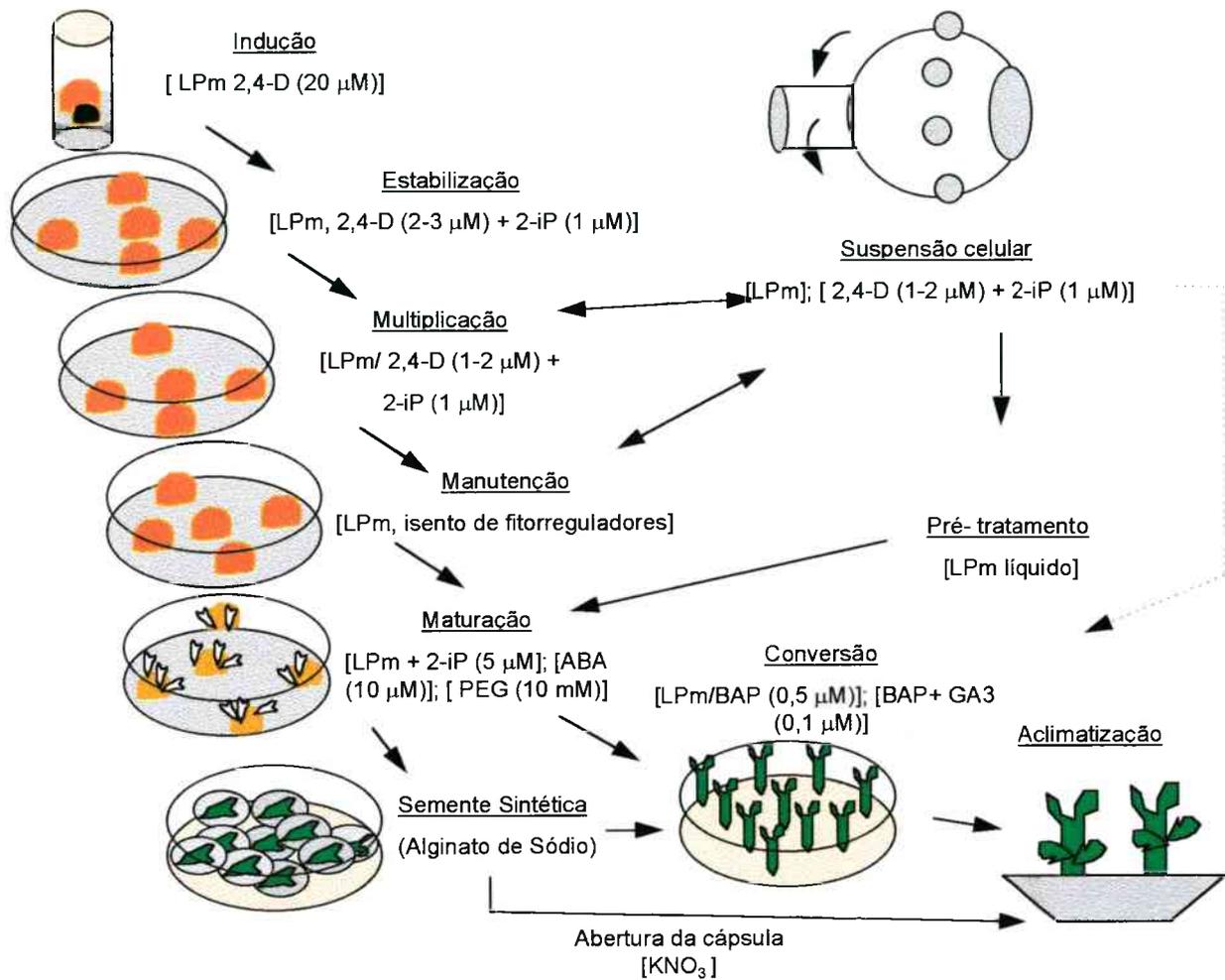


Fig. 12. Rotas de obtenção e desenvolvimento de culturas embriogênicas de *Feijoa sellowiana* Berg, CCA/UFSC, 1998.

Fig. 13. **a)** Estádios de desenvolvimento dos ES de *F sellowiana* (G = globular; C = cordiforme; TP = torpedo precoce; T = torpedo; PCT = pre-cotiledonar e CT = cotiledonar) (x 2,5); **b)** embriogênese somática em estádios de G e C, cinco semanas após a inoculação (x 3,1); **c)** ES sincrônica e de alta frequência nos estádios TP-T, sete semanas após a inoculação (x 1,9), **d)** ES sincrônica nos estádios de PCT (x 1,9); **e)** ES assincrônicos nos estádios CT e CTT = cotiledonar tardio (x 1,25); **f)** ES de baixa frequência (x 1,25), CCA/UFSC, 1998.

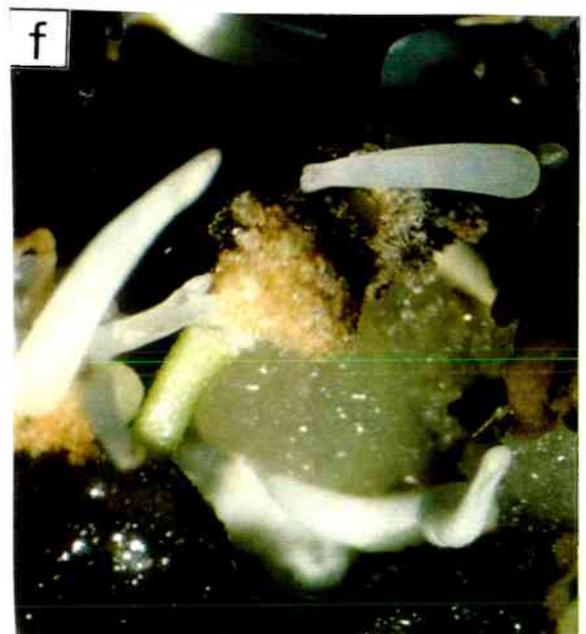
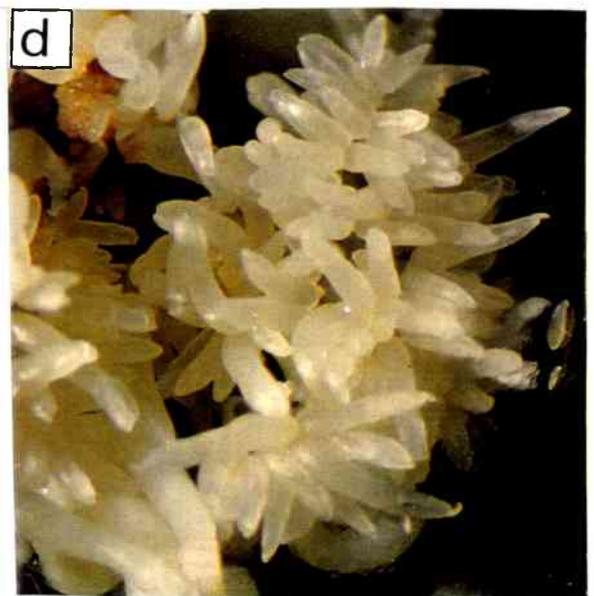
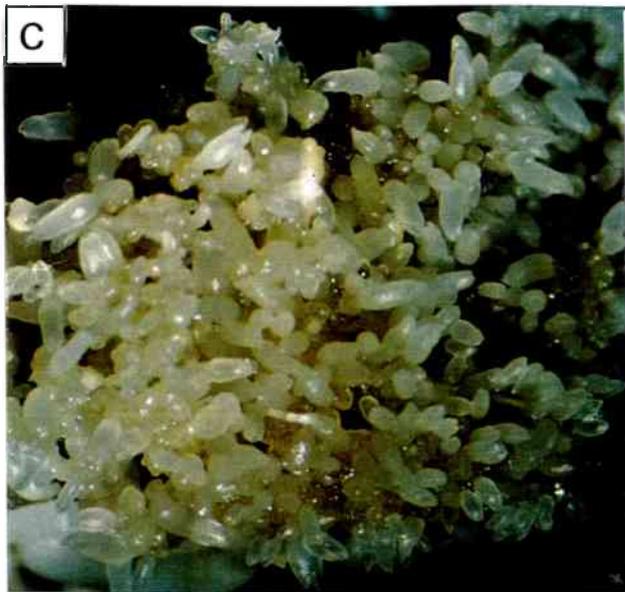
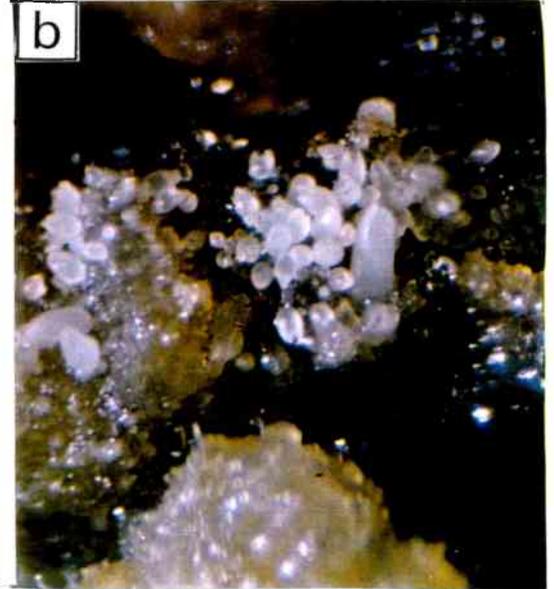
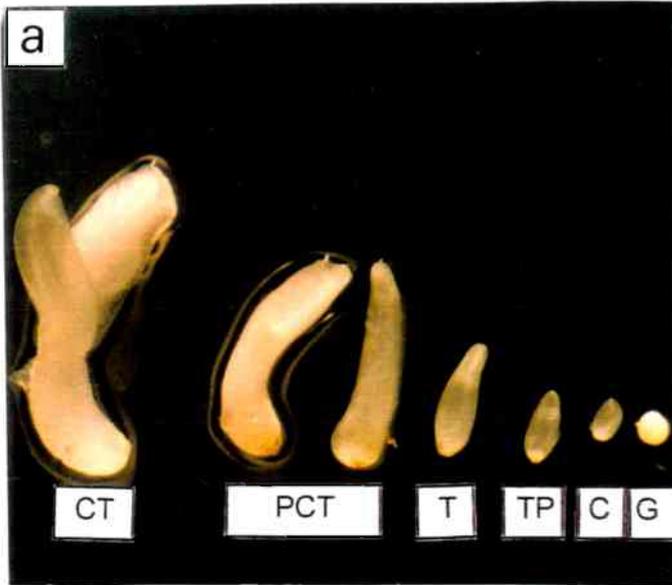


Fig. 14. Indução da ES a partir de meios de cultura basal LPm contendo: **a)** proporção de 100 % de NO_3^- (x 1,9); **b)** Proporção de 100 % de NH_4^+ com baixa proliferação celular (x 1,25); **c)** Proporção zero de N. Notar massa celular escura; **d)** presença de Gln como única fonte de N. Notar massa celular friável e ES de baixa frequência (x 2,5); **e)** Indução e desenvolvimento de ES direta com pulso de duas semanas em 2,4-D, após 10 semanas de cultivo (x 1,25), **f)** Progressão rápida para estádios cotiledonares em meio de cultura isento de 2,4-D (x 1,25), CCA/UFSC, 1998.

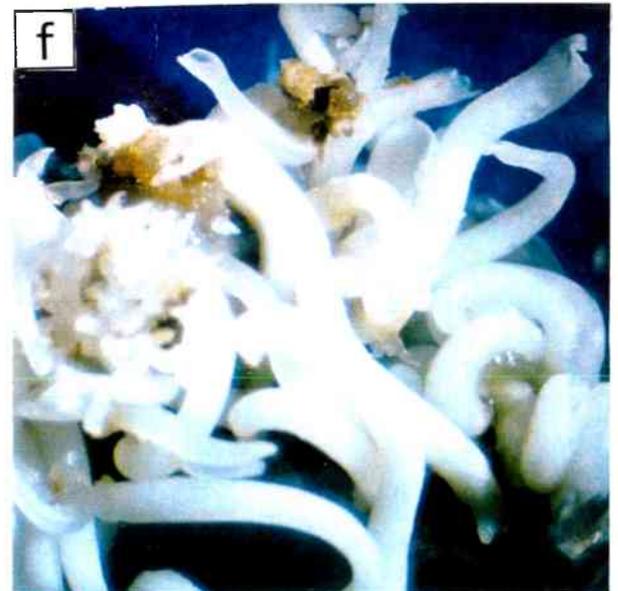
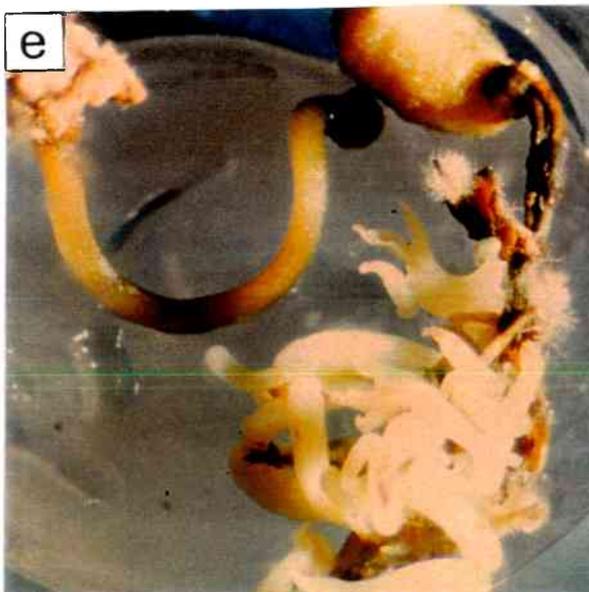
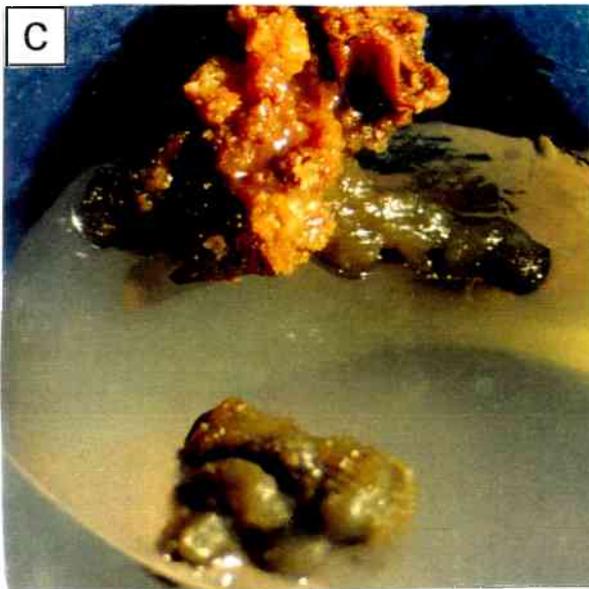
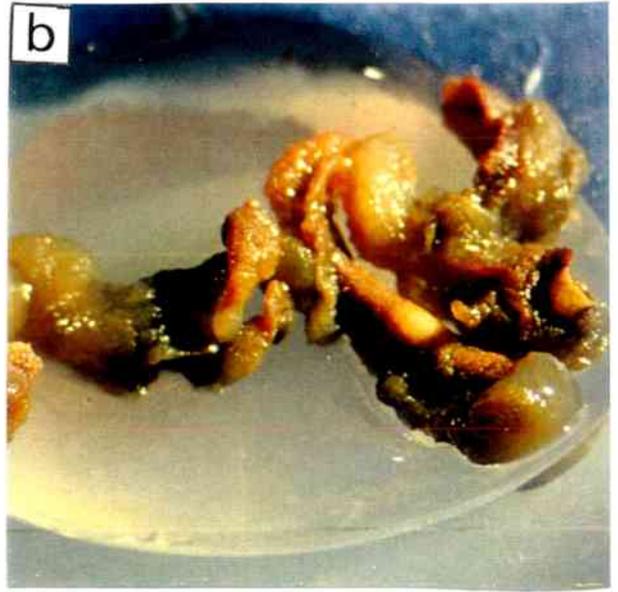
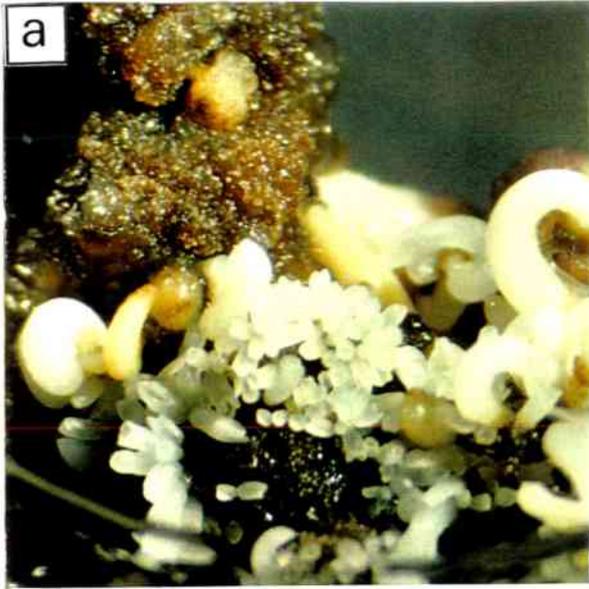


Fig. 15. a) Corte longitudinal da folha cotiledonar mostrando a ES direta sobre a epiderme, aos dezesseis dias de cultivo (x 33); b) ES globulares surgindo da camada da epiderme e sub-epiderme aos 24 dias (x 66) e c) divisões periclinais e anticlinais (x 66), e d) ES cordiformes sobre a camada epidérmica, aos 24 dias (x 33); e) ES indireta originada sobre massa celular embriogênica, 30 dias (x 66), e f) ES pré-cotiledonar e cotiledonares de alta freqüência, originados sobre a camada da epiderme, 70 dias após a inoculação (x 33). c = cordiforme; ct = cotiledonar; da = divisões anticlinais; dp = divisões periclinais; es = embriões somáticos; ep = epiderme; g = globular; pc = pró-cambio; pct = pré-cotiledonar; sep = subepiderme; sp = suspensor, CCA/UFSC, 1998.

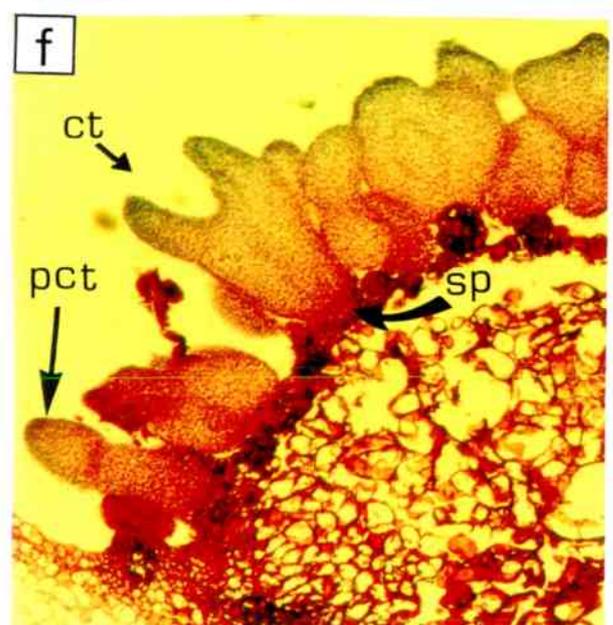
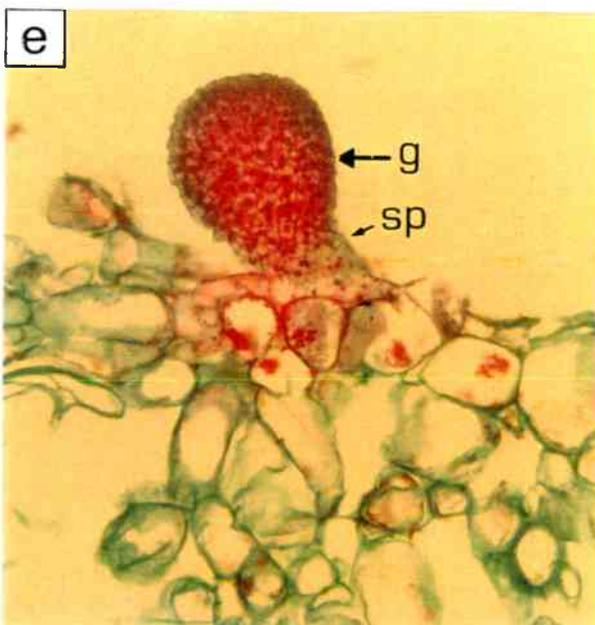
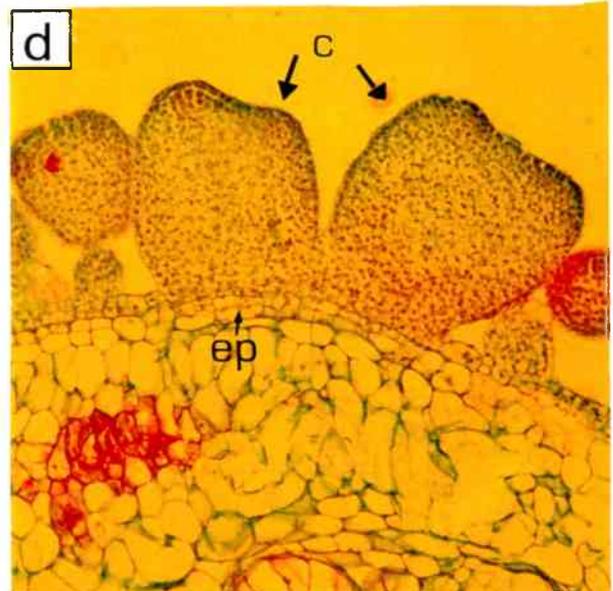
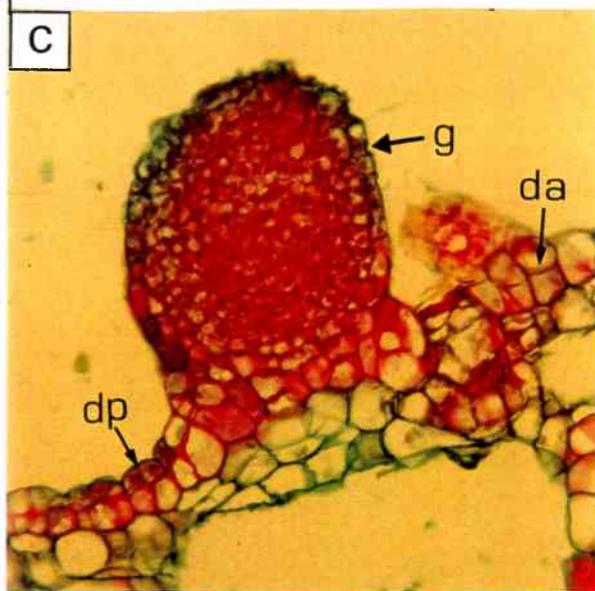
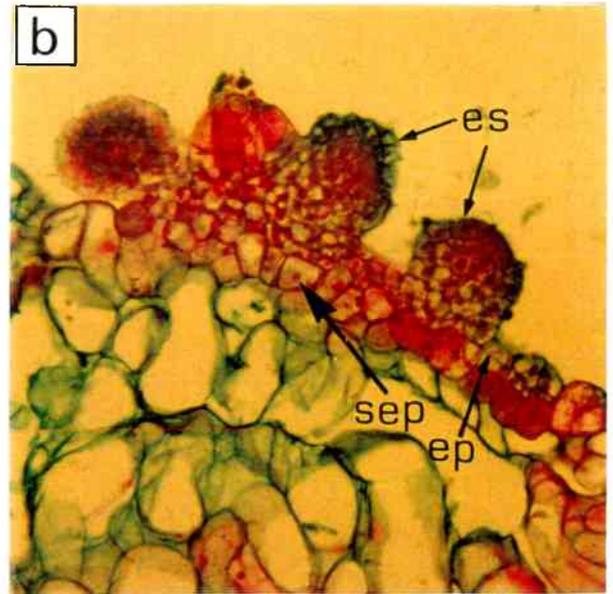
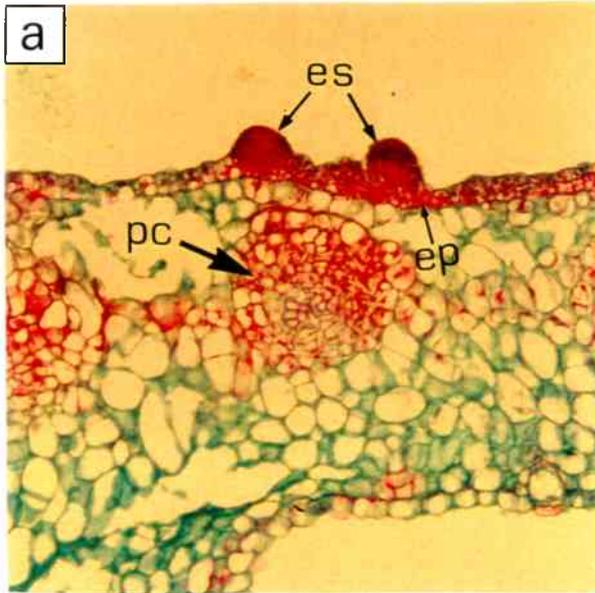


Fig. 16. a) Indução de massas celulares embriogênicas (setas) em meio de cultura basal contendo 2,4-D (20 μ M), 70 dias após a inoculação (x 1,25); b) Massa celular de multiplicação rápida (seta) com característica friável e granular (x 1,9); c) ES repetitiva com estruturas granulares compostas de embriões somáticos globulares (x 2,5); d) Massa celular (calo) não embriogênica (seta; x 1,25); e) Linhagem celular embriogênica transferida para meio de cultura geleificado revelando alta taxa de regeneração (x 3,1); f) Massas celulares de tamanho maiores (setas menor) com baixa taxa de regeneração e de tamanho menores (seta maior) com maior potencial de multiplicação, CCA/UFSC, 1998.

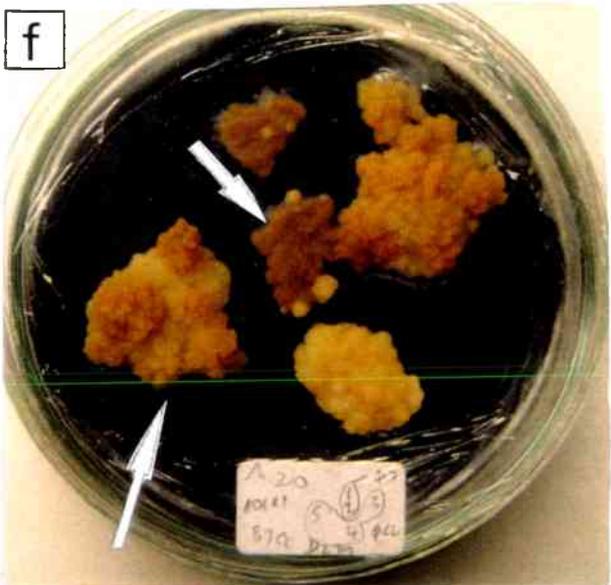
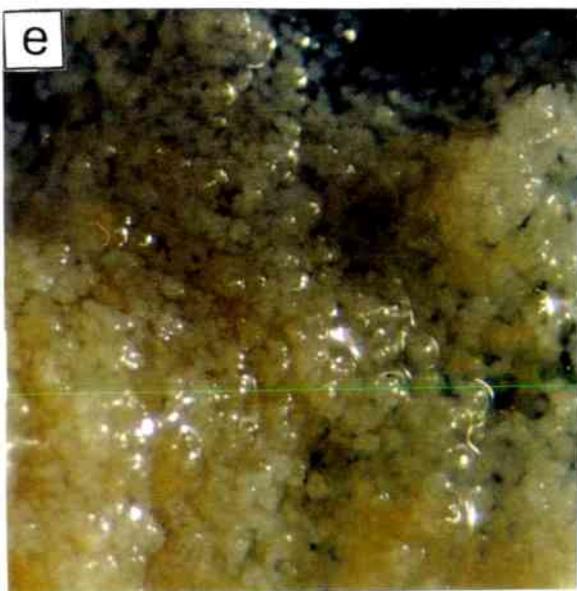
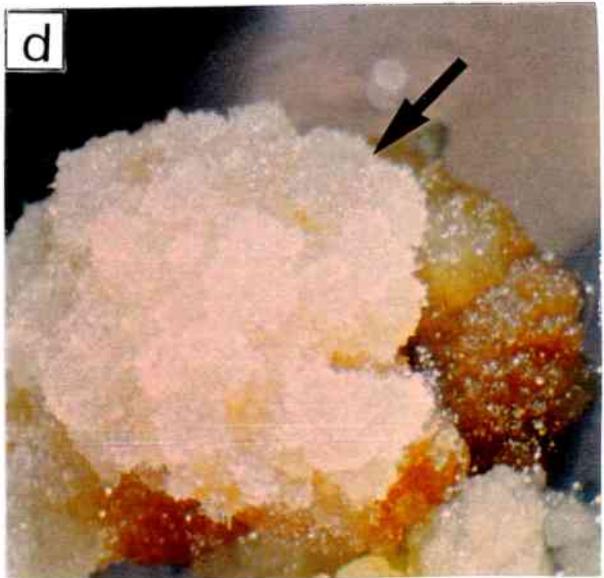
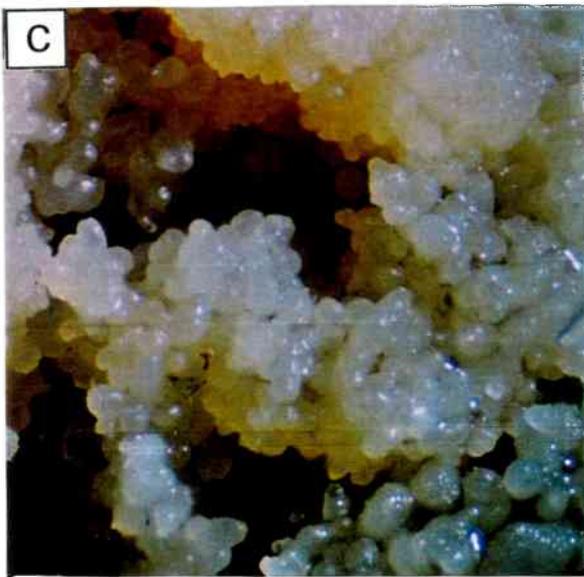
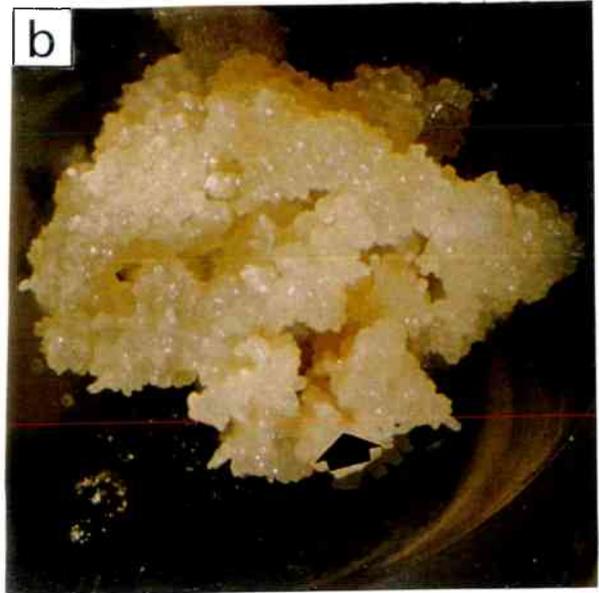
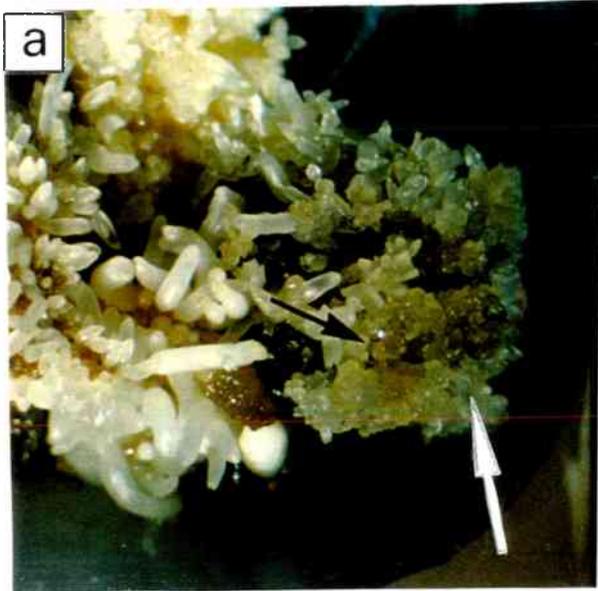


Fig. 17. **a)** Linhagem celular embriogênica (LCE) subcultivada em 2,4-D (3-5 μ M) com perda parcial da capacidade embriogênica (x 1,9); **b)** LCE de baixa capacidade de regeneração; **c)** LCE originada em meio de cultura basal LPm, líquido e isento de fitorreguladores, transferidas para o mesmo meio de cultura basal geleificado com início de maturação (x 1,9), e **d)** LCE permanentemente subcultivada em meio basal geleificado, promovendo a maturação de ES de forma sincrônica e alta frequência (x 2,5); **e)** LCE com cinco subcultivos em meio de cultura basal líquido e isento de fitorreguladores, quando transferidas para meio de cultura basal geleificado, adicionado de 2-iP (5 μ M) e posteriormente repicados para o mesmo meio basal contendo ABA e/ou PEG, promoveram a maturação de ES (setas) de baixa frequência (x1,9), e **f)** quando mantidas na presença de 2,4-D não maturaram, permanecendo em constante proliferação (x 1,9), CCA/UFSC, 1998.

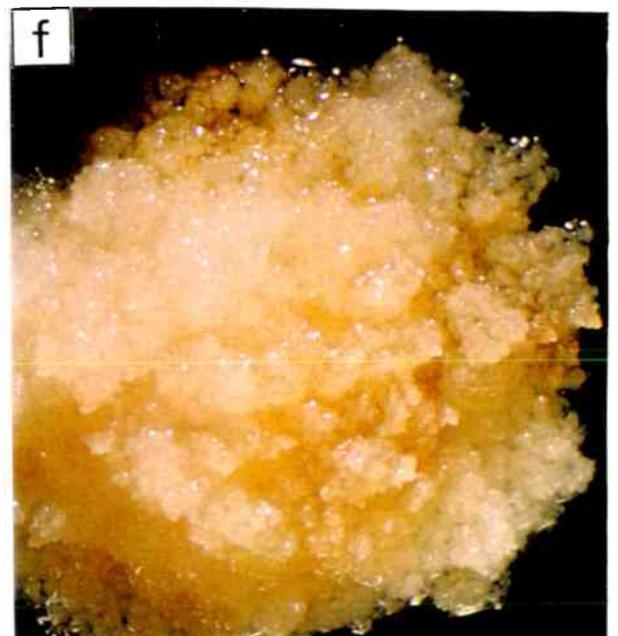
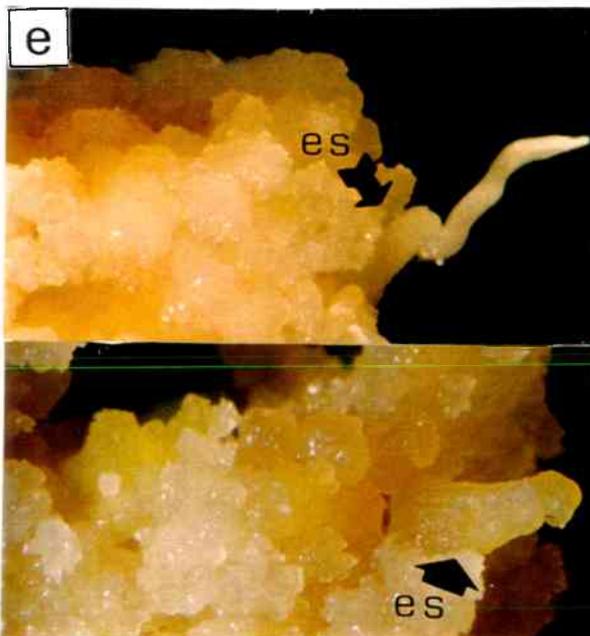
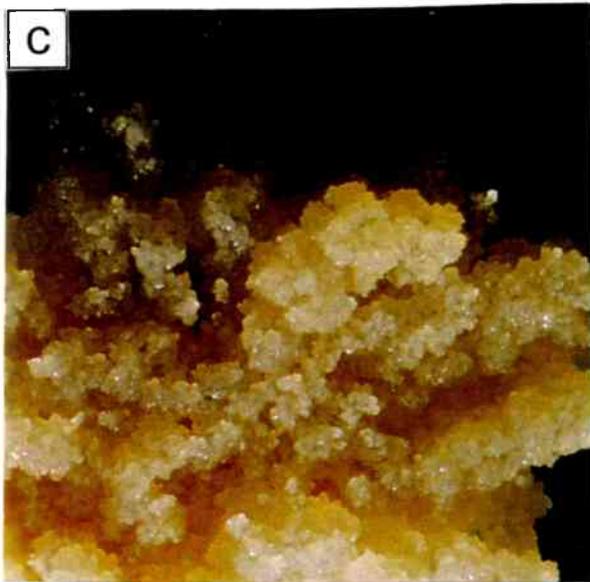
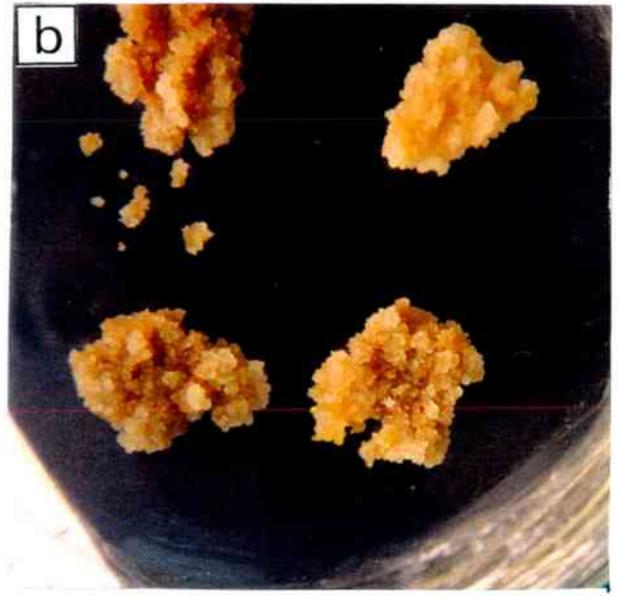
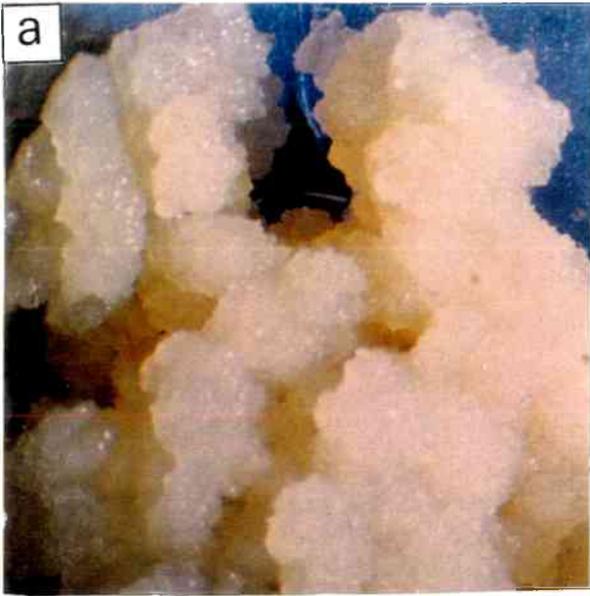


Fig. 18. Análises histoquímicas das linhagens celulares originadas do meio de multiplicação em suspensão celular revelaram características de células embriogênicas: **a)** Células embriogênicas de tamanho pequeno (20-30 μM), isodiamétricas com citoplasma denso (seta) e formando aglomerados (x 33); **b)** Células embriogênicas apresentando forte reação ao Carmin Acético (2%); com núcleo grande, indicado pelas nucleoproteínas e organelas (setas); demonstrando alta capacidade de divisão celular (x 330); **c)** Células (seta) apresentando acúmulo de grãos de amido (x 330); **d)** Células (seta) com presença de corpos lipídicos (x 330); **e-f)** Linhagem celular embriogênicas apresentando a evolução da fase de maturação dos ES: **e)** Processo de organização de estruturas, observadas pelo aglomerado de células e fortemente coradas com Carmim Acético (x 66), **f)** que se condensam em estruturas maciças característico de ES pré-globulares e globulares de forma repetitiva (x 33). a = amido; ag = aglomerados de células; eg = embrião globular; cl = corpos lipídicos ; n = núcleo; pe = pró-embrião, CCA/UFSC, 1998.

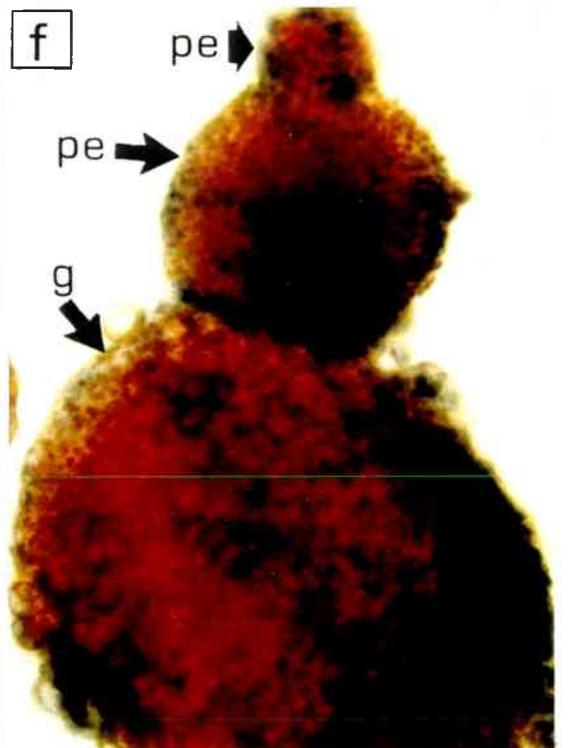
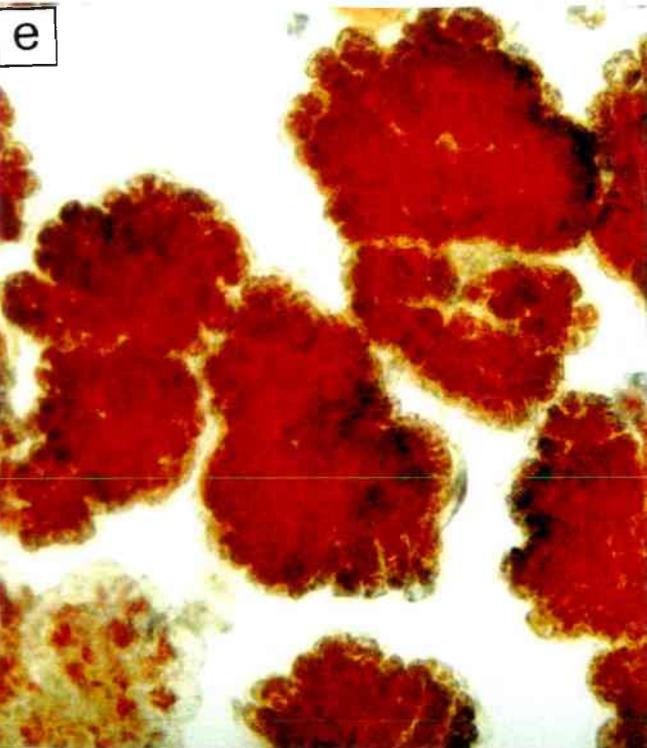
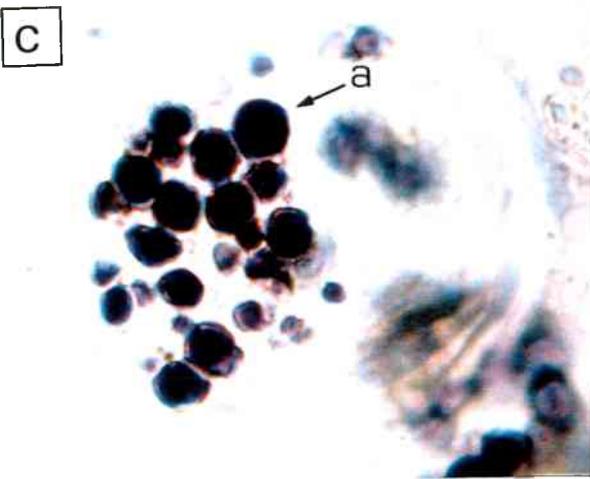
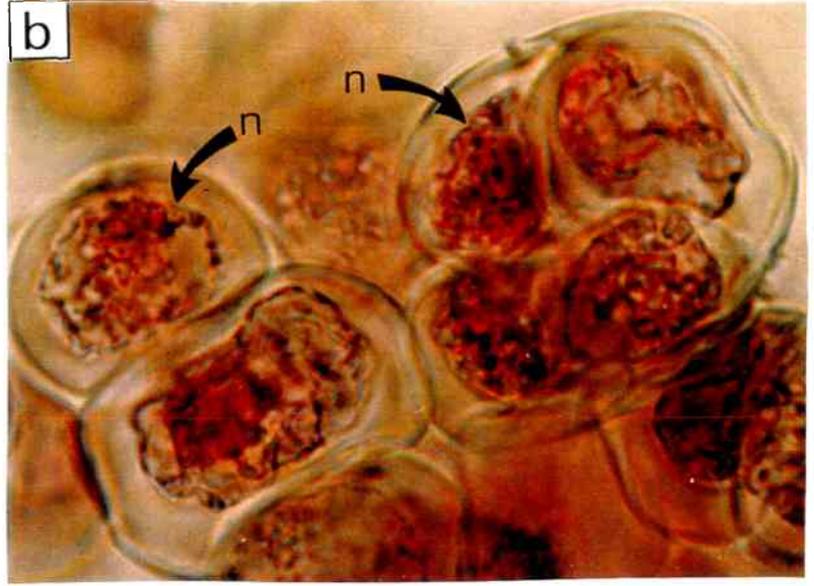
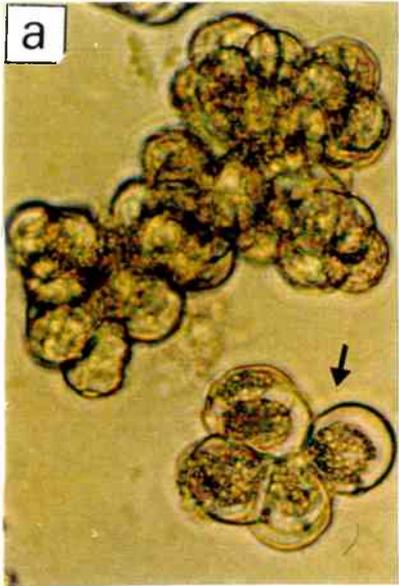


Fig. 19. Conversão de ES em meio de cultura basal LPm, adicionado de BAP (0,5 μ M) e GA₃ (0,1 μ M): **a)** Emissão da radícula, uma semana após a inoculação (x 1,25) e **b)** abertura do cotilédone duas semanas após a inoculação (x 1,9) **c)** Plântulas germinadas a partir de sementes sintéticas em cápsulas de hidrogel; abertura da cápsula pela descomplexação do Ca⁺⁺ com KNO₃ (x 2,5), **d)** Quando tratadas com água, as cápsulas mantiveram-se numa consistência firme permitindo a emissão da radícula para fora (x 1,9); **e)** ES convertidos em plântulas completas (x 1,25); **f)** Plântulas completas originadas do meio de germinação, CCA/UFSC, 1998.

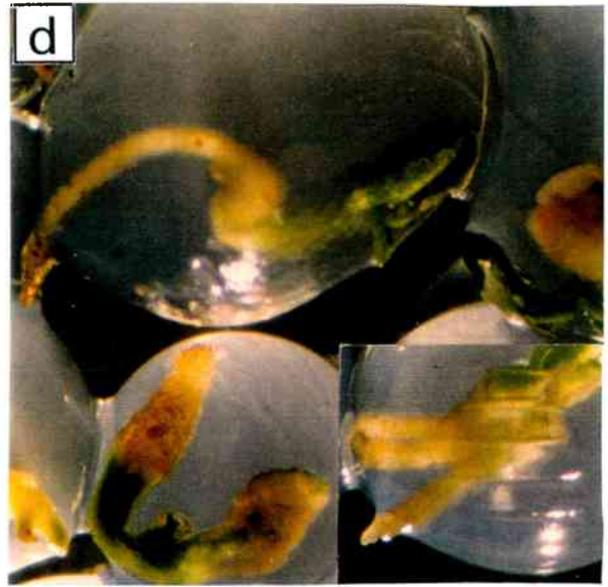
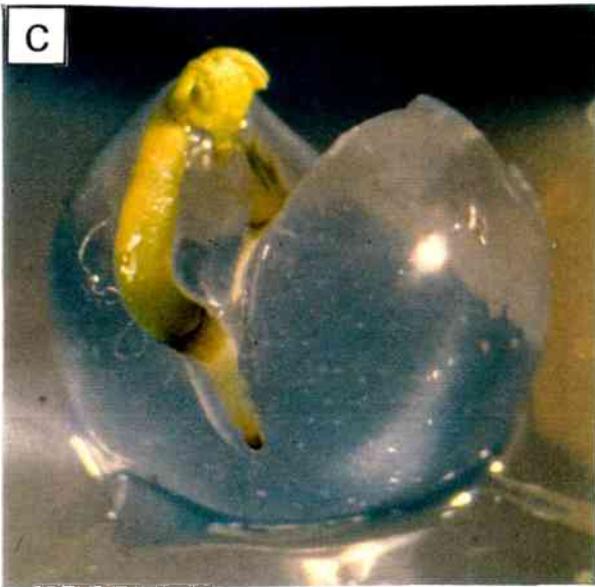


Tabela 1. Composição e concentração (mg/l e mM) das formulações salinas utilizadas nos meios de cultura básico, CCA/UFSC/1998.

Composição	MS		LPm		WPM	
	mg/l	mM	mg/l	mM	mg/l	mM
Macronutrientes						
NH ₄ NO ₃	1650	20,6	1200	15,0	400	5,0
KNO ₃	1900	18,8	1900	19,0	-	5,5
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	3,0	180	1,2	96	0,65
Ca(NO ₃) ₂	-	-	-	-	556	2,35
KH ₂ PO ₄	170	1,25	340	2,5	170	1,25
K ₂ SO ₄	-	-	-	-	990	5,68
MgSO ₄ 7H ₂ O	370	1,5	370	1,5	370	1,5
Micronutrientes						
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3	100	19,0	50	37,3	100
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	100	14,0	50	27,8	100
MnSO ₄ .H ₂ O	16,9	100	1,69	10	16,9	100
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	30	2,88	10	8,6	30
H ₃ BO ₃	6,2	100	0,63	10	6,2	100
KI	0,83	5,0	0,75	4,5	-	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,1	0,0025	0,01	0,25	1,0
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	1,0	0,025	0,1	0,25	1,0
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,1	0,0025	0,01	-	-

MS = Murashige & Skoog (1962); LPm = Von Arnold & Eriksson (1981); WPM = Lloyd & McCown (1981)

Tabela 2. Resumo da análise da variância da percentagem de explante com ES (% de ES) e do número de ES por explante (Nº. de ES), para cinco acessos de *F sellowiana* Berg, cultivados em meio de cultura LPM (von Arnold & Eriksson, 1981), adicionado de 2,4-D (20 µM), cinco, dez e quinze semanas após a inoculação, CCA/UFSC, 1998.

Causa de Variação	GL	Quadrado Médio					
		5 semanas		10 semanas		15 semanas	
		% de ES	Nº. de ES	% de ES	Nº. de ES	% de ES	Nº. de ES
Acessos	4	270,00 ns	9,279 ns	2.807,5 **	2,9955 *	3.020,0 **	184,53 ns
Resíduo	15	260,00	7,781	156,667	0,9727	246,667	97,979
Total	19						
CV (%)		76,8%	91,3%	20,5%	¹ 23,0%	25,7%	51,2%

** P ≤ 0,01; * P ≤ 0,05; ns = não significativo; ¹ dados transformados em $(X + 0,5)^{0,5}$.

Tabela 3. Resumo da análise da variância para a percentagem de explante com ES (% de ES) e do número de ES por explante (Nº. de ES), originados a partir de EZ imaturos extraídos de frutos com 75 a 120 dias após a antese, do acesso 101 de *F. sellowiana* Berg, em meio de cultura com diferentes formulações salinas, adicionado de 2,4-D (10 e 20 µM) e Gln (0 e 4 mM), cinco, dez, quinze e vinte semanas após a inoculação, CCA/UFSC, 1998.

Causa de Variação	GL	Quadrado Médio											
		5 semanas		10 semanas		15 semanas		20 semanas					
		% de ES	Nº. de ES	% de ES	Nº. de ES	% de ES	Nº. de ES	% de ES	Nº. de ES	% de ES	Nº. de ES	% de ES	Nº. de ES
Bloco	3	0,6006	4,7813	0,4941	17,2844	0,1541	11,1541	684,2	2,38354				
Fatores:													
A: Formulação salina	2	0,0139 ns	1,9033 ns	0,0108 ns	7,5233 **	0,0714 *	12,0881 **	526,6 *	5,9258 **				
B: 2,4-D	1	0,0408 ns	0,0469 ns	0,1752 ns	0,0533 ns	0,0169 ns	1,5052 ns	1,070,7 **	0,6302 ns				
C: Gln	1	1,1408 **	14,1919 **	0,7752 **	24,9408 **	0,3502 **	18,3769 **	3,060,8 **	9,6302 **				
Interações													
AB	2	0,1202 ns	0,7300 ns	0,0758 ns	1,3233 ns	0,0019 ns	2,2852 ns	370,6 ns	0,7158 ns				
AC	2	0,0627 ns	0,6300 ns	0,0008 ns	0,9858 ns	0,0164 ns	1,6556 ns	1,380,6 **	3,1108 *				
BC	1	0,0833 ns	0,7752 ns	0,0019 ns	0,1008 ns	0,0019 ns	0,9919 ns	4,7502 ns	0,9918 ns				
ABC	2	0,0314 ns	0,4933 ns	0,0325 ns	1,2108 ns	0,0019 ns	0,5744 ns	100,9 ns	0,3225 ns				
Residuo	33	0,0810	0,8547		1,0840		1,7911	146,3948	0,8189				
Total	47												
CV (%)		¹ 20,9%	² 41,3%	¹ 14,2%	² 30,9%	¹ 7,8%	² 37,2%	26,0%	² 35,0%				

** P ≤ 0,01; * P ≤ 0,05; ns = não significativo; ¹ dados transformados em log (X + 2); ² dados transformados em (x + 0,5)^{0,5}.

Tabela 4. Percentagem de explantes com ES *(% de ES) a partir de EZ imaturos do acesso 101 de *F. sellowiana* Berg, cultivados nas formulações salinas: LPm (von Arnold & Eriksson, 1981), MS (Murashige & Skoog, 1962) e WPM (Lloyd & McCown, 1980) adicionado de 2,4-D (10 e 20 µM) e Gln (0 e 4 mM), cinco, dez, quinze e vinte semanas após a inoculação, CCA/UFSC, 1998.

2,4-D (µM)	Gln (mM)	5 semanas									10 semanas									15 semanas									20 semanas								
		Formulação salina			Formulação salina			Formulação salina			Formulação salina			Formulação salina			Formulação salina			Formulação salina			Formulação salina			Formulação salina			Formulação salina								
		LPm	MS	WPM	Média	LPm	MS	WPM	Média	LPm	MS	WPM	Média	LPm	MS	WPM	Média	LPm	MS	WPM	Média	LPm	MS	WPM	Média	LPm	MS	WPM	Média								
10	0	25,1	17,5	12,6	45,0	35,0	32,5	28,2 A	59,4	43,3	39,4	50,6 A	61,2	35,6	32,5	56,7 A	65,0	50,0	64,2	51,4 A																	
	4	43,8	40,0	30,0	63,8	72,5	55,0	50,6 A	70,6	63,1	64,1	56,7 A	65,0	50,0	64,2	56,7 A	65,0	50,0	64,2	51,4 A																	
20	0	22,6	21,2	22,5	45,1	26,2	30,0	28,0 A	59,2	40,2	37,5	41,9 A	43,6	37,5	21,9	54,2 A	41,9	43,3	63,8	42,0 B																	
	4	40,0	25,0	36,9	50,0	45,0	55,0	28,0 A	65,6	60,8	62,1	41,9 A	41,9	43,3	63,8	54,2 A	41,9	43,3	63,8	42,0 B																	
Média		32,9 a	25,9 a	25,5 a	28,1	51,0 a	44,7 a	43,1 a	46,3	63,7 a	51,9 a	50,8 a	55,5	52,9 a	41,6 b	45,6 ab	46,7																				
Gln		4			36,0 A			56,9 A			64,4 A			54,7 A																							
(mM)		0			20,3 B			35,6 B			46,5 B			38,7 B																							

* Médias de 4 repetições; letras indicam valores que diferem estatisticamente entre si, na linha (letras minúsculas) e na coluna (letras maiúsculas), para o teste SNK (5%).

Tabela 5. Número de embriões somáticos por explante *(número de ES) a partir de EZ imaturos do acesso 101 de *F. sellowiana* Berg, cultivados nas formulações salinas: LPm (von Arnold & Eriksson, 1981), MS (Murashige & Skoog, 1962) e WPM (Lloyd & McCown, 1980) adicionado de 2,4-D (10 e 20 μ M) e Gln (0 e 4 mM), cinco, dez, quinze e vinte semanas após a inoculação, CCA/UFSC, 1998.

2,4-D (μ M)	Gln (mM)	5 semanas						10 semanas						15 semanas						20 semanas						
		Formulação salina			Formulação salina			Formulação salina			Formulação salina			Formulação salina			Formulação salina			Formulação salina						
		LPm	MS	WPM	Média	LPm	MS	WPM	Média	LPm	MS	WPM	Média	LPm	MS	WPM	Média	LPm	MS	WPM	Média	LPm	MS	WPM	Média	
0	0	7,7	2,0	0,7	16,7	5,3	3,1	21,1	7,4	4,0	21,1	7,4	4,0	21,1	7,4	4,0	21,1	7,4	4,0	21,1	7,4	4,0	21,1	7,4	4,0	
10	4	12,9	7,8	6,6	6,3 A	24,5	16,0	13,9	13,2 A	22,2	12,6	12,2	13,2 A	22,2	12,6	12,2	13,2 A	22,2	12,6	12,2	13,2 A	22,2	12,6	12,2	13,2 A	
0	0	2,8	4,0	2,5	13,2	6,7	6,0	20,4	6,3	6,7	20,4	6,3	6,7	20,4	6,3	6,7	20,4	6,3	6,7	20,4	6,3	6,7	20,4	6,3	6,7	
20	4	12,4	4,4	6,8	5,5 A	29,9	9,3	19,8	14,2 A	34,3	11,4	27,0	17,7 A	34,3	11,4	27,0	17,7 A	34,3	11,4	27,0	17,7 A	34,3	11,4	27,0	17,7 A	
Média		9,0 a	4,5 a	4,2 a	5,9	21,1 a	9,3 b	10,7 b	13,7	24,5 a	9,4 b	12,5 b	15,4	24,5 a	9,4 b	12,5 b	15,4	24,5 a	9,4 b	12,5 b	15,4	24,5 a	9,4 b	12,5 b	15,4	
Gln	4			8,5 A			18,9 A					20,0 A													10,0 A	
(mM)	0			3,3 B			8,5 B					11,0 B														5,1 B

* Médias de 4 repetições; letras indicam valores que diferem estatisticamente entre si, na linha (letras minúsculas) e na coluna (letras maiúsculas), para o teste SNK (5%).

Tabela 6. Resumo da análise da variância para a percentagem de explante com ES (% de ES) e número de ES por explante (Nº. de ES) a partir de EZ imaturos do acesso 101 de *F. sellowiana* Berg, em meio de cultura LPM (von Arnold & Eriksson, 1981) contendo diferentes proporções de $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$, adicionado de Gln, cinco, dez, quinze e vinte semanas após a inoculação, CCA/UFSC, 1998.

Causa de Variação	GL	Quadrado Médio							
		5 semanas		10 semanas		15 semanas		20 semanas	
		% de ES	Nº. de ES						
Bloco	3	1,0830	5,0982	0,3502	7,4830	0,1847	6,4842	0,0949	1,6582
Fatores:									
A: Relação $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$	4	0,5129 **	2,4479	0,7441 **	7,9690 **	1,1834 **	14,0628 **	1,6852 **	9,1975 **
B: Gln	1	2,2090 **	3,4222 *	2,2562 **	12,100 **	1,9360 **	12,2102 **	1,8062 **	4,5562 *
Interações									
AB	4	0,1196 ns	2,2941 *	0,1081 ns	0,8112 ns	0,3354 **	0,8452 ns	0,3325 **	0,7562 ns
Resíduo	27	0,1308	0,8516	0,1215	1,5526	0,0804	1,5379	0,0518	0,8262
Total	39								
CV (%)		¹ 40,4%	² 56,2%	¹ 30,1%	² 53,2%	¹ 22,9%	² 48,2%	¹ 18,5%	² 44,1%

** $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$; ns = não significativo; ¹ dados transformados em $\log(X + 2)$; ² dados transformados em $(X + 0,5)^{0,5}$.

Tabela 7. Percentagem de explante com ES* (% de ES) a partir de EZ imaturos do acesso 101 de *Feijoa sellowiana* Berg, em meio de cultura LPM (von Arnold & Eriksson, 1981) contendo diferentes proporções de de $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ (00:00; 00:49; 15:34; 34:15 e 49:00 mM), e adicionado de Gln (0 e 4 mM) e 2,4-D (20 μM), cinco, dez, quinze e vinte semanas após a inoculação, CCA/UFSC, 1998.

Relação $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$	5 semanas				10 semanas				15 semanas				20 semanas			
	Gln		Gln		Gln		Gln		Gln		Gln		Gln		Gln	
	0 mM	4 mM	Média	4 mM	0 mM	4 mM	Média	4 mM	0 mM	4 mM	Média	4 mM	0 mM	4 mM	Média	4 mM
15:34	20,0	15,0	17,5 A	25,0	30,0	27,5 A	42,5 a	42,5 a	42,5 a	42,5 A	42,5 a	41,2 ab	42,5 a	41,9 A		
34:15	15,0	25,0	20,0 A	25,0	37,5	31,3 A	30,0 a	42,5 a	36,3 A	37,5 ab	53,2 a	45,3 A				
00:49	2,5	32,5	17,5 A	15,0	37,5	26,3 A	20,0 a	37,5 a	28,8 A	25,0 ab	35,0 ab	30,0 A				
49:00	2,5	12,5	7,5 B	5,0	27,5	16,3 A	0,0 b	25,0 a	12,5 B	0,0 c	17,5 ab	8,8 B				
00:00	0,0	12,5	6,2 B	0,0	15,0	7,5 B	2,5 b	22,5 a	12,5 B	0,0 c	17,5 b	8,8 B				
Média	8,0 b	19,5a	13,8	14,0 b	29,5 a	21,8	19,0 b	34,0 a	26,5	20,8 b	33,2 a	26,9				

* Médias de 4 repetições; letras indicam valores que diferem : letras minúsculas na linha e letras maiúsculas na coluna, para o teste SNK (5%).

Tabela 8. Número de embriões somáticos por explante *(número de ES) a partir de EZ imaturos do acesso 101 de *F. sellowiana* Berg, em meio de cultura LPM (von Arnold & Eriksson, 1981) contendo diferentes proporções de $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ (00:00; 00:49;15:34; 34:15 e 49:00 mM), adicionado de Gln (0 e 4 mM) e 2,4-D (20 μM), cinco, dez, quinze e vinte semanas após a inoculação, CCA/UFSC, 1998.

Relação $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$	5 semanas				10 semanas				15 semanas				20 semanas			
	Glutamina		Glutamina		Glutamina		Glutamina		Glutamina		Glutamina		Glutamina		Glutamina	
	0 mM	4 mM	Média	4 mM	0 mM	4 mM	Média	4 mM	0 mM	4 mM	Média	4 mM	0 mM	4 mM	Média	4 mM
15:34	6,4	3,9	5,1	14,9	17,5	16,2 A	13,6	27,2	20,4 A	5,9	16,8	11,3 A				
34:15	6,8	3,9	5,3	7,5	9,1	8,3 AB	12,4	14,6	13,5 A	10,2	9,7	10,0 A				
00:49	0,2	12,5	6,3	3,1	18,0	10,5 AB	6,1	15,6	10,9 A	3,5	7,7	5,6 A				
49:00	0,2	1,7	1,0	0,4	3,4	1,9 C	0,0	2,4	1,2 B	0,0	1,0	0,5 A				
00:00	0,0	1,8	0,9	0,0	3,0	1,5 C	0,1	2,6	1,4 B	0,0	1,1	0,6 A				
Média	2,7 A	4,8 A	3,7	5,2 B	10,2 A	7,6	6,4 B	12,5 A	9,5	3,9 B	7,3 A	5,6				

* Médias de 4 repetições; letras indicam valores que diferem : letras minúsculas na linha e letras maiúsculas na coluna, para o teste SNK (5%).

Tabela 9. Resumo da análise da variância para a percentagem de explante com ES (% de ES) e número de ES por explante (Nº. de ES), do acesso 101 de *F. sellowiana* Berg, em resposta à suplementação com os aminoácidos Asp, Arg e gln ao meio de cultura basal LPM (von Arnold & Eriksson, 1981), adicionado de 2,4-D (10 µM), dez semanas após a inoculação, CCA/UFSC, 1998.

Causa de Variação	GL	Quadrado Médio	
		% de ES	Nº. de ES
Aminoácidos	3	1215,625 **	482,285 ns
Resíduo	12	154,947	264,241
Total	15		
CV (%)		18,3%	51,9%

** P ≤ 0,01; * P ≤ 0,05; ns = Não Significativo.

Tabela 10. Resumo da análise da variância para a percentagem de explante com ES (% de ES) e número de ES por explante (Nº. de ES) do acesso 101 de *F. sellowiana* Berg, em resposta a diferentes níveis de gln adicionado ao meio de cultura basal LPM (von Arnold & Eriksson, 1981) e 2,4-D (10 µM), dez semanas após a inoculação, CCA/UFSC, 1998.

Causa de Variação	GL	Quadrado Médio	
		% de ES	Nº. de ES
Níveis de glutamina	4	698,906 **	9,5507 **
Resíduo	15	139,375	1,8455
Total	19		
CV (%)		17,4 %	¹ 23,6%

** P ≤ 0,01; * P ≤ 0,05; ns = Não Significativo, ¹ dados transformados em $(X + 0,5)^{0,5}$

Tabela 11. Resumo da análise da variância para a percentagem de explantes com ES (% de ES) e do número de ES por explante (Nº de ES), de acesso 101 de *F. sellowiana* Berg, em resposta a pulsos de 1; 2; 4; 8 e 16 semanas em 2,4-D (20 µM) em meio de cultura basal LPM (von Arnold & Eriksson, 1981), adicionado de gln (4 mM), cinco, dez, quinze e vinte semanas após a inoculação, CCA/UFSC, 1998.

Causa de Variação	GL	Quadrado Médio											
		5 semanas		10 semanas		15 semanas		20 semanas					
		% de ES	Nº. de ES	% de ES	Nº. de ES	% de ES	Nº. de ES	% de ES	Nº. de ES	% de ES	Nº. de ES	% de ES	Nº. de ES
Pulsos de 2,4-D	4	2.225,31**	5,868 **	1.280,0 **	11,083 **	1.139,38 **	6,217 **	3.567,5 **	7,244 **				
Resíduo	15	239,48	0,801	63,33	1,596	214,17	0,69	175,0	0,97				
Total	19												
CV (%)		28,9%	¹ 24,4%	9,7%	¹ 18,2%	19,0%	¹ 22,0%	33,5%	¹ 35,5%				

** P ≤ 0,01; * P ≤ 0,05; ns = não significativo. ¹ dados transformados em (X + 0,5)^{0,5}

Tabela 12. Resumo da análise da variância para a percentagem de explante com ES (% de ES) e o número de ES por explante (Nº. de ES) a partir de EZ coletados em diferentes estádios de maturação dos frutos (dias após a antese), do acesso 101 de *F. sellowiana* Berg, em resposta ao meio de cultura LPM (von Arnold & Eriksson, 1981), adicionado de 2,4-D (20 µM) e gln (4 mM), cinco, dez e quinze semanas após a inoculação, CCA/UFSC, 1998.

Causa de Variação	GL	Quadrado Médio					
		5 semanas		10 semanas		15 semanas	
		% de ES	Nº. de ES	% de ES	Nº. de ES	% de ES	Nº. de ES
Bloco	3	0,0422	0,682	0,045	0,8591	13,4439	0,9626
Antese	4	0,4475 **	6,1293 **	0,3014**	16,250 **	2.342,8 **	8,6231 **
Resíduo	12	0,0189	0,8192	0,0236	0,9695	86,6527	1,450
Total	19						
CV (%)		¹ 9,7%	² 32,0%	¹ 9,3%	² 21,5%	14,6%	27,4%

** $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$; ns = não significativo; ¹ dados transformados em $\log(x + 2)$; ² dados transformados em $(x + 0,5)^{0,5}$.

Tabela 13. Resumo da análise da variância para a percentagem de explante com ES (% de ES) e número de ES por explante em resposta a diferentes períodos de armazenamento (meses a 4° C) das sementes do acessos 101 de *F. sellowiana* Berg, dez semanas após a inoculação, CCA/UFSC, 1998.

Causa de Variação	GL	Quadrado Médio	
		% de ES	Nº. de ES
Bloco	3	143,8982	1,1819
Armazenamento	5	31,5454 ns	4,7636 **
Resíduo	15	39,4732	0,1915
Total	23		
CV (%)		8,0 %	¹ 6,6 %

** $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$; ns = não significativo; ¹ dados transformados em $(X + 0,5)^{0,5}$.

Tabela 14. Resumo da análise da variância para a percentagem de conversão de ES em plântulas completas, cotilédones abertos, emissão radicular e sem resposta, do acesso 101 de *F. sellowiana* Berg, em meio de cultura L_{Pm}, adicionados de diferentes citocininas combinados com GA₃, duas semanas após a inoculação, CCA/UFSC, 1998.

Causa de Variação	GL	Quadrado Médio			
		Plantas completas	Cotilédones abertos	Emissão da radícula	Sem resposta
Bloco	2	0,925	167,322	72,337	41,0629
Fatores:					
A: Citocininas	3	144,659 **	169,914 **	8,390 ns	641,893 **
B: GA ₃	1	45,375 *	130,107 *	76,252 *	87,707 ns
Interações					
AB	3	22,766 ns	9,108 ns	30,522 ns	68,838 ns
Resíduo	14	9,681	19,799	16,69	39,711
Total	23				
CV (%)		39,5%	50,3%	70,8%	8,1%

** P ≤ 0,01; * P ≤ 0,05; ns = não significativo.

Tabela 15. Percentagem de conversão de ES em plântulas completas, cotilédones abertos, emissão radicular e sem resposta, do acesso 101 de *F. sellowiana* Berg, em meio de cultura LPM (von Arnold & Eriksson, 1981) adicionados de BAP (0; 0,5 μ M), Kin (0,5 μ M) e ZiP (0,5 μ M) combinados com GA₃ (0; 0,1 μ M), duas semanas após a inoculação, CCA/UFSC, 1998.

Citocininas (μ M)	Plantas Completas			Cotilédones abertos			Emissão da radícula			Sem resposta		
	GA ₃ (μ M)			GA ₃ (μ M)			GA ₃ (μ M)			GA ₃ (μ M)		
	0	0,1	Média	0	0,1	Média	0	0,1	Média	0	0,1	Média
BAP 0,5	10,5	19,0	14,7 A	13,5	19,0	16,2 A	5,9	5,2	5,6 A	70,0	56,8	63,4 B
ZiP 0,5	7,4	8,2	7,8 B	4,6	12,6	8,7 B	11,5	3,4	7,5 A	76,3	75,8	76,0 A
0,0	4,5	6,4	5,5 B	2,5	5,1	3,8 B	8,6	1,9	5,3 A	84,3	86,6	85,4 A
Kin 0,5	3,5	3,4	3,4 B	5,3	8,1	6,7 B	4,2	5,4	4,8 A	87,0	83,2	85,1 A
Média	6,5 b	9,2a	7,8	6,5 b	11,2 a	8,8	7,6 a	4,0 a	5,8	79,4 a	75,6 a	77,5

* Médias de 3 repetições; letras indicam valores que diferem: letras minúsculas na linha e letras maiúsculas na coluna, para o teste SNK (5%).

Tabela 16. Resumo da análise da variância da porcentagem de conversão de ES em plântulas completas, cotilédones abertos, emissão radicular e sem resposta, do clones 101 de *F. sellowiana* Berg, em meio de cultura adicionado de BAP e GA₃, duas semanas após a inoculação, CCA/UFSC, 1998.

Causa de Variação	GL	Quadrado Médio			
		Plantas completas	Cotilédones abertos	Emissão da radícula	Sem resposta
Bloco	2	448,222	168,014	26,494	94,955
Fatores:					
A: BAP	2	27,22 ns	8,221 ns	88,309 **	275,232 ns
B: GA ₃	1	0,252 ns	4,909 ns	1,742 ns	2,067 ns
Interações					
AB	2	64,095 ns	47,411 ns	5,896 ns	7,027 ns
Resíduo	10	58,9	107,317	8,5946	106,569
Total	17				
CV (%)		43,3 %	39,8 %	63,2%	19,9 %

** P ≤ 0,01; * P ≤ 0,05; ns = não significativo.

Tabela 17. Percentagem de conversão de ES em plântulas completas, cotilédones abertos, emissão radicular e sem resposta, do acesso 101 de *F. sellowiana* Berg, em meio de cultura LPM (von Arnold & Eriksson, 1981) adicionados de BAP (0,25; 0,5; 1,0 μM), combinados com GA₃ (0,1 e 0,5 μM), duas semanas após a inoculação, CCA/UFSC, 1998.

BAP (μM)	Plantas Completas			Cotilédones abertos			Emissão da radícula			Sem resposta		
	GA ₃ (μM)			GA ₃ (μM)			GA ₃ (μM)			GA ₃ (μM)		
	0,1	0,5	Média	0,1	0,5	Média	0,1	0,5	Média	0,1	0,5	Média
0,25	19,2	19,3	19,2 A	24,7	29,9	27,3 A	10,4	7,6	9,0 A	45,8	43,2	44,5 A
0,5	21,8	15,5	18,7 A	24,2	27,5	25,8 A	2,6	3,8	3,2 B	51,5	53,2	52,3 A
1,0	11,9	18,7	15,3 A	27,7	22,3	25,0 A	1,9	1,6	1,8 B	58,5	57,4	58,0 A
Média	17,9 b	17,8 a	17,7	25,5 a	26,6 a	26,0	5,0 a	4,3 a	4,6	51,9 a	51,2 a	51,6

* Médias de 3 repetições; letras indicam valores que diferem : letras minúsculas na linha e letras maiúsculas na coluna, para o teste SNK (5%).

Tabela 18. Resumo da análise da variância para a percentagem de conversão de sementes sintéticas em plântulas completas, emissão radícula, cotilédones abertos, sem resposta e cápsula contaminada, do acesso 101 de *Feijoa sellowiana* Berg, em diferentes composições de endosperma artificial (EA) e tratamentos de abertura de cápsulas, em quinze dias após a transferência para sala de incubação, CCA/UFSC, 1998.

Causa de Variação	GL	Quadrado Médio				
		Plantas completas	Emissão da radícula	Cotilédones abertos	Sem resposta	Cápsula Contaminada
Bloco	4	574,301	289,648	371,587	1,430	2,920
Fatores:						
A: Endosperma	3	408,425 ns	683,684 **	111,262 ns	0,742 *	1,173 **
B: Abertura	1	1916,84 **	2768,896 **	25,760 ns	0,304 ns	0,140 ns
Interações						
AB	3	487,888 *	681,639 **	322,278 *	0,187 ns	0,081 ns
Resíduo	28	161,40	136,459	99,1839	0,2088	0,1357
Total	39					
CV (%)		47,5 %	28,7 %	58,3 %	¹ 51,4 %	¹ 28,1 %

** P ≤ 0,01; * P ≤ 0,05; ns = não significativo, ¹ = dados transformados em log (x+2).

Tabela 19. Percentagem de conversão de sementes sintéticas em plântulas completas, emissão radicular, cotilédones abertos, cotilédones abertos, sem resposta e cápsulas contaminadas, a partir de ES do acesso 101 de *Feijoa sellowiana* Berg, em diferentes composições de endosperma artificial¹ (EA) e tratamentos de abertura de cápsulas com H₂O e KNO₃ (200 mM), quinze dias após a transferência para sala de incubação, CCA/UFSC, 1998.

Endosperma Artificial ¹	Plântulas Completas			Emissão da radícula			Cotilédones abertos			sem resposta			Cápsulas Contaminadas		
	H ₂ O	KNO ₃	Média	H ₂ O	KNO ₃	Média	H ₂ O	KNO ₃	Média	H ₂ O	KNO ₃	Média	H ₂ O	KNO ₃	Média
EA 3	19,1 b	51,2 a	35,1 A	65,7 a	29,8 bc	47,8 A	15,3	12,0	13,6 A	0,0	7,0	3,5 B	62,3	64,7	63,5 A
EA 1	19,1 b	36,4 ab	28,8 A	36,0 bc	38,1 bc	37,0 AB	18,3	12,7	15,5 A	26,6	12,8	19,7 A	20,7	13,0	16,9 B
EA 4	22,9 b	24,0 b	23,7 A	42,3 bc	19,0 c	30,7 B	12,1	30,7	21,4 A	22,7	25,8	24,3 A	76,0	68,3	72,2 A
EA 2	18,1 b	22,5 b	20,3 A	51,9 ab	42,4 bc	47,1 A	19,4	16,1	17,9 A	10,6	19,0	14,8 A	23,6	19,5	21,6 B
Média	19,8 b	33,7 a	26,7	49,0 a	32,3 b	40,6	16,3 a	17,9 a	17,1	15,0 a	16,2 a	15,6	46,6 a	41,4 a	44,0

* Médias de 5 repetições; letras indicam valores que diferem : letras minúsculas na linha e letras maiúsculas na coluna, para o teste SNK (5%).

1 - EA 1 = Alginato de sódio (1%) + GA₃ (0,05 µM) + Kin (0,5 µM)

EA 2 = Alginato de sódio (1%) + GA₃ (0,05 µM) + Kin (0,5 µM) + Caseína Hidrolizada (500 mg/l)

EA 3 = Alginato de sódio (1%) + GA₃ (0,05 µM) + Kin (0,5 µM) + Caseína Hidrolizada (500 mg/l) + ½ LPM + Vitaminas de Morel

EA 4 = Alginato de sódio (1%) + Caseína Hidrolizada (500 mg/l) + ½ LPM + Vitaminas de Morel.

Tabela 20. Resumo da significância dos coeficientes e dos modelos matemáticos (equações), para as análises de regressão, CCA/UFSC, 1998.

Modelo matemático	Significância do coeficiente *			Valor-P
	a	b	c	
$Y = -0,306x^2 + 8,922x - 1,15 \quad r^2 = 0,9983$	0.03	0.03	0.71	0.04
$Y = -0,231x^2 + 7,097x - 10,125 \quad r^2 = 0,9718$	0.17	0.14	0.46	0.16
$Y = -0,204x^2 + 5,212x - 12,55 \quad r^2 = 0,9985$	0.02	0.02	0.05	0.03
$Y = -0,111x^2 + 2,933x - 8,875 \quad r^2 = 0,9543$	0.14	0.13	0.24	0.21
$Y = -0,103x^2 + 3,477x + 4,775 \quad r^2 = 0,9989$	0.00	0.00	0.02	0.00
$Y = -0,046x^2 + 2,026x - 1,15 \quad r^2 = 0,9943$	0.14	0.08	0.72	0.05
$Y = -0,106x^2 + 2,846x - 7,0 \quad r^2 = 0,9714$	0.12	0.11	0.23	0.16
$Y = -0,05x^2 + 1,346x - 2,9 \quad r^2 = 0,9625$	0.13	0.13	0.30	0.16
$Y = -0,084x^2 + 5,657x + 15,349 \quad r^2 = 0,9776$	0.31	0.24	0.03	0.01
$Y = -1,129x^2 + 12,119x + 46,351 \quad r^2 = 0,955$	0.05	0.03	0.01	0.04
$Y = -0,85x^2 + 21,15x - 72,5 \quad r^2 = 0,9972$	0.03	0.03	0.05	0.05
$Y = -888x^2 + 19,076x - 16 \quad r^2 = 0,9711$	0.13	0.16	0.66	0.17
$Y = -0,55x^2 + 13,05x + 16,25 \quad r^2 = 0,9985$	0.03	0.03	0.12	0.04
$Y = -0,45x^2 + 12,15x + 16,25 \quad r^2 = 0,9818$	0.09	0.09	0.33	0.13
$Y = -0,557x^2 + 12,215x + 18,475 \quad r^2 = 0,903$	0.24	0.27	0.65	0.31
$Y = -0,032x^2 + 0,3528x + 79,854 \quad r^2 = 0,833$	0.14	0.39	0.00	0.07
$Y = -0,21x^2 + 3,0466x + 45,607 \quad r^2 = 0,8798$	0.04	0.10	0.00	0.04

* a = ax^2 ; b = bx ; c = constante; valor-P = Significância do Modelo

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adiga, P.R.; Prasad, G. L. Biosynthesis and regulation of polyamines in higher plants. *Plant Growth Regulation*, n.3, p.205-226, 1985.
- Alemanno, L.; Berthouly, M.; Michaux-Ferriere, N. A comparison between *Theobroma cacao* L. zygotic embryogenesis and somatic embryogenesis from floral explants. *In vitro Cell. Dev. Biol.*, v.33, p.163-172, 1997.
- Alemanno, L.; Berthouly, M.; Michaux-Ferriere, N. A. Histology of somatic embryogenesis from floral tissues cocoa. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. n.46, p.187-194, 1996.
- Ammirato, P. V. Embryogenesis. In: Evans, D. A.; Sharp, W. R.; Ammirato, P. V.; Yamada, Y. (eds.) *Handbook of Plant Cell Culture*. New York : MacMillan Publishing Co, 1983, 970p.
- Andrade, E.R. de; Ducroquet, J.P.H.J. Antracnose em goiabeira serrana. IN.: CONGRESSO IBEROAMERICANO, 1, CONGRESSO LATINO AMERICANO, 5, 1992, Montevidéu. *Anais...* Montevidéu, 23-27 mar., 1992. p.31.
- Archambault, J.; Lavoie, L.; Williams, R.D.; Chavarie, C. Nutritional aspects of *Daucus carota* somatic embryo cultures performed bioreactors. In: Terzi, M. et al. (eds), *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*, Dordrecht: Kluwer Acad. Pu. p.681-687, 1995.
- Attree, S.; Fowke, L. Embryogeny of Gymnosperms: Advances In Synthetic Seed Technology So Conifers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. n.35, p.1-35, 1993.
- Bagni, N.; Biondi, S. Polyanimes. In.: Bonga, J.M; Durzan, D. J. *Cell and Tissue culture in Forestry*. v.1, Dordrecht: Martinus Nijhoff Pu. p.113-124, 1987.
- Bailey, M.A; Boerma, H.R.; Parrot, W.A.;. Genotype effects on repetitive embryogenesis and plant regeneration of soybean. *In vitro Cell. Dev. Biol.*, v.29, p. 102-108, 1993
- Baker, C.M.; Wetzstein, H.Y. Repetitive somatic embryogenesis in peanut cotyledon cultures by continual exposure to 2,4-D. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, n.40, p.249-254, 1995.
- Barrett, J.D.; Park, Y.S.; Bonga, J.M. The effectiveness of various nitrogen sources in white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss] somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, n.16, p.411-415, 1997.
- Bassi, G.; Cossio, F. Risultati di ricerque sulla micropropagazione della Feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg) *L'informatore Agrario*, p.79-80, 1993.
- Bellarosa, R.; Mo, L.H.; von Arnold, S. The influence of auxin and cytokinin in proliferation and morphology of somatic embryos of *Picea abies* (L.) Karst. *Ann. Botany*. n.70, p.199-206, 1992.
- Bhojwani, S.S., Mullins, K.; Cohen D. Micropropagation of *Feijoa sellowiana* Berg. *Acta Horticulture*, n.212, p.69-76, 1987.
- Buyukalaca, S.; Mavituna, F. Somatic embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, n.46, p.227-235, 1996.
- Caldas, L.S.; Haridasan P. Ferreira, M.E. Meios Nutritivos In.; Torres, A.C.; Caldas L.S. *Técnicas e Aplicações da Cultura de tecidos de Plantas*. Brasília ABCTP/EMBRAPA-SNPH, 1990, p.37-70, 433 p.
- Canhoto, J.M.; Cruz, G.S. *Feijoa sellowiana* Berg (Pineapple Guava). In: Bajaj, Y.P.S. (ed.),

- Trees IV. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. v. 35, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, p.156-172, 1996 a.
- Canhoto, J.M.; Cruz, G.S. Histodifferentiation of somatic embryos in cotyledons of pineapple guava (*Feijoa sellowiana* Berg. **Protoplasma** , v.191, p.34-45, 1996 b.
- Canhoto, J.M.; Cruz, G.S. Improvement of somatic embryogenesis in *Feijoa sellowiana* Berg (Myrtaceae) by manipulation of culture media composition. **In vitro Cell. Dev. Biol.**, v.30, p.21-25, 1994.
- Carimi, F.; De Pasquale, F.; Crescimanno, F.G. Somatic embryogenesis in Citrus from styles culture, **Plant Science**. n.105, p.81-86, 1995.
- Carrier, D.J.; Cunnigham, J.E; Taylor, D.C.; Dunstan, D.I. Sucrose requirements and lipid utilization during germination of interior spruce (*Picea glauca engelmannii* complex) somatic embryos. **Plant Cell Report**, n.16, p.550-554, 1997.
- Compton, M. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data.. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n.37, p.217-242, 1994.
- Craig, A.L.; Morrison, I.; Baird, E.; Waugh, R. Coleman, M.; Davie, P. Fahleson, J.; Eriksson, I.; Glimelius, K. Intertribal somatic hybrids between *Brassica napus* and *Barbarea vulgaris* - production of in vitro plantlets. **Plant Cell Report**, n.13, p.441-416, 1994.
- Cruz, G. S.; Calhoto, J.M.; Abreu, M. A. V. Somatic embryogenesis and Plant Regeneration from Zygotic Embryos of *Feijoa sellowiana* Berg. **Plant Science**, v.66, n.2, p.263-270, 1990.
- Dal Vesco, L.L.; Guerra, M.P. Micropropagação da goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana* Berg.) I: Fatores determinantes da organogênese. **Rev. Fruticultura Brasileira**. 1998. (no prelo)
- David, H.; David, A.; Bade, P.; Millet, J.; Morvan, O.; Morvan, C. Cell wall composition and morphogenic response in callus derived from protoplasts of two fibre flax. (*Linum usitatissimum* L.) genotypes. **J. Plant Physiol.** v.143, p.379-384, 1994.
- de Jong, A.J.; Schmidt, E.D.L.; Vries, S.C. Early events in higher-plant embryogenesis. **Plant Molecular Biology**, n.22, p.367-377, 1993.
- Debergh, P.C. Evolution and automation in micropropagation and artificial seed production. In: Terzi, M., et al. (eds.) **Current Issues in Plant Molecular Biology**, Dordrecht: Kluwer Academic Pu., p. 95-104, 1995.
- Deng, M-De.; Cornu, D. Maturation and germination of walnut somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n.28, p.195-202, 1992.
- Deverno, L.L. An evaluation of somaclonal variation during somatic embryogenesis. In: Jain, S.M.; Gupta, P.K.; Newton, R.J.(eds.), **Somatic embryogenesis in woody plants**, v.1 - History, molecular and biochemical aspects, and applications. Dordrecht: Kluwer Academic Pu. p.3610-377, 1995.
- Dodeman, V.L.; Ducreux, G.; Kreis, M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. **Journal Experimental of Botany**. v.48, n.313, p.1493-1509, 1997.
- Duarte, O.R.; Fachinello, J.C.; Santos Filho. B.G. dos. Multiplicação da goiabeira serrana através de estacas semilenhosas. **Pesq. Agrop. Bras**, Brasília, v.27, n.3, p.513-516, 1992.
- Ducroquet, J.P.H.J.; Hickel, E.R. Birds as pollinators of feijoa (*Acca sellowiana* Berg). **Acta Horticulturae**, v.452, p.37-40, 1997.
- Ducroquet, J.P.H.J.; Ribeiro, P. A.. Goiaba Serrana: Fatores climáticos trazem a pesquisa de volta ao centro de origem da espécie. **Rev. Agrop. Catarinense**, EPAGRI. Florianópolis-SC, v.9, n.3, p.13-15, 1996.
- Ducroquet, J.P.H.J.; Ribeiro, P. A.. Goiaba Serrana: Velha conhecida, nova alternativa. **Rev.**

- Agrop. Catarinense**, EMPASC. Florianópolis-SC, v.4, n.3, p.27-29, 1991
- Dudits, D. Györgyey, J. Bögre, L.; Bakó, L. Molecular biology of somatic embryogenesis. In: THORPE, T. A. (ed.). **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Pu. p.267-308, 1995.
- Dunstan, D.I.; Tautorus, T.E.; Thorpe, T.A. Somatic embryogenesis in woody plants. In: Torpe, T.A. (ed.), **In vitro embryogenesis in plants**, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.471-538, 1995.
- Durzan, D.J. Ammonia: its Analogues, metabolic products and site of action in somatic embryogenesis. In.: Bonga, J.M; Durzan, D. J. (eds.) **Cell and Tissue culture in Forestry**. v.2, Dordrecht: Martinus Nijhoff Pu. p.92-136, 1987.
- Durzan, D.J. Process control in somatic polyembryogenesis. In: Frans Kempe Symposium Molecular Genetics of Forest Trees, 8, 1988, Sweden, **Proceeding...** Sweden: J.-E. Hällgren, p.147-186, 1988.
- Durzan, D.J., Nitrogen Metabolism and vegetative propagation of forest trees. In.: Bonga, J.M; Durzan, D. J. (eds.) **Cell and Tissue culture in Forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Pu. p.257-324, 1985.
- Evreinoff, D. V. A. Étude Promologique sur le Feijoa. **J. D' Agric. Tropicale et de Botanique Appliquée**. n.2, p.5-6, 1955.
- Fachinello, J.C.; Mielke, M.S.; Nachtigal, J. de C. Propagação vegetativa de goiabeira serrana. **Rev. Bras. de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.14, n.3, p.233-236, 1992.
- Firm, R.D. Growth substance sensitivity: The need for clearer ideas, precise terms and purposeful experiments. **Physiol. Plant.**, n.67, p.267-272, 1986.
- Fuggi, A.; Abenavoli, A.; Muscolo, A.; Panuccio, M.R. Glutamine synthetase in cell from carrot (*Daucus carota* L.): Interaction between phosphinothricin and glutamate. In.: Terzi, M. et al. (eds), **Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology**, Netherlands, Kluwer Acad. Pu. p.589-594, 1995.
- George, E.F. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Part 1. The Technology. 2. Ed., Edington: Exegetics, 1993, 574 p.
- Goldberg, R.B., Paiva, G., Yadegari, R. Plant Embryogenesis: Zygote to Seed. **Science**, v.266, p.605-614, 1994.
- Gomes da Cunha, A.C.; Ferreira, M.F. Somatic embryogenesis, organogenesis and callus growth Kinetics of flax. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n.47, p.1-8, 1996
- González-Benito, M.E.; Frota-Chagas Carvalho, J.M.; Pérez, C. Somatic of an early cotton cultivar. **Pesq. agropec. bras.**, v.32, n.5, p.485-488, 1997.
- Gray, D.J. Introduction to the symposium. **HortScience**, v.22, n.5, p.796-797, 1987.
- Gray, D.J. Somatic embryogenesis and plant regulation from immature zygotic of Muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) cultivars. **Am. J. Bot.**, v.79, n.5, p.542-546, 1992.
- Gray, D.J. Somatic embryogenesis in grape. In: Jain, S.M.; Gupta, P.K.; Newton, R.J. (eds.), **Somatic embryogenesis in woody plants**, v.2 - Angiosperms. Dordrecht: Kluwer Academic Pu., p.191-217, 1995.
- Gray, D.J., Purohit, A. Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.10, n.1, p.33-61, 1991.
- Gray, D.J., Stepan-Sarkissian; Fowler, M.W. Biochemistry of forest tree species in culture In.: Bonga, J.M; Durzan, D. J. **Cell and Tissue culture in Forestry**. v.2, Dordrecht. Martinus Nijhoff Pu. p.31-60, 1987, 447 p.

- Gray, D.J.; McColley, D.W.; Compton, M.E. High-frequency somatic embryogenesis from quiescent seed cotyledons of *Cucumis melo* cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* V.118, n.3, p.425-432, 1993.
- Guerra, M.P.; Handro, W. Somatic embryogenesis in tissue cultures of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). In: Ahuja, R. (ed.). **Woody Plant Biotechnology**. New York: Plenum Press, p.189-196, 1991.
- Guerra, M.P.; Handro, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae): Control and structural features. **Journal of Plant Research**. n 111, p. 65-71, 1998
- Guerra, M.P.; Pescador, R. Dal Vesco, L.L.; Nodari, R.O.; Ducroquet, J.P.H.J. *In vitro* morphogenesis in *Feijoa sellowiana*: Somatic embryogenesis and plant regeneration. **Acta Horticulture**, v.452, p.27-36, 1997.
- Guerra, M.P.; Teixeira, J.B.; Torres, A.C. Embriogênese somática e semente sintética. In: Torres, A.C. (ed.). **Técnicas e Aplicações da Biologia Celular e Molecular em Plantas**. Brasília: Embrapa. 1998. (no prelo).
- Gupta, P.; Durzan, D. Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine. **Bio/technology**, n.5, p.147-151, 1987.
- Gupta, P.K.; Grob, J.A. Somatic embryogenesis in conifers. In: Jain, S.M.; Gupta, P.K.; Newton, R.J.(eds.), **Somatic embryogenesis in woody plants**, v.1, Dordrecht: Kluwer Academic Pu. p.81-98, 1995.
- Gyulai, G.; Janovszky, J.; Kiss, E. Lelik, L.; Csillag, A.; Heszky, L.E. Callus initiation and plant regeneration from inflorescence primordia of the intergeneric hybrid *Agropyron repens* (L.) Beauv X *Bromus inermis* Leyss, cv. Nanus on a modified nutritive medium. **Plant cell Report**, n.11, p.266-269, 1992.
- Halperin, W. Alternative morphogenetic events in cell suspensions. **Am. J. Bot.**, n.53, p.443-451, 1966.
- Halperin, W. *In vitro* embryogenesis: Some historical issues and unresolved problems. In: Thorpe T. A. (ed.). **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Pu. p.1-16, 1995.
- Handley, L.W. Future uses of somatic embryogenesis in woody plantation species. In: Jain, S.M.; Gupta, P.K.; Newton, R.J.(eds.), **Somatic embryogenesis in woody plants**, v.1 - History, molecular and biochemical aspects, and applications. Dordrecht: Kluwer Academic Pu. p.415-434, 1995.
- Harry, I.S.; Thorpe, T.A.. Somatic embryogenesis and plant regeneration from mature zygotic embryos of red spruce. **Botanical Gazette**, v.152, n.4, p.446 - 452, 1991.
- Hristoforoglu, K.; Schmidt, J.; Bolhar-Nordenkamp, H. Development and germination of *Abies alba* somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n.40, p.277-284, 1995.
- Johansen, D.A.. **Plant microtechnique**. New York, McGraw-Hill. 1940, 523 p
- Jordan, M. Velozo, J. Improvement of somatic embryogenesis in highland-papaya cell suspensions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n.44, p.189-194, 1996.
- Joy, R.W. IV; Kumar, P.P.; Thorpe, T.A.. Long-term storage of somatic embryogenic white spruce tissue at ambient temperature. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. n.25, p.53-60, 1991.
- Kendurkar, S.V.; Nadgauda, R.S.; Phadke, C.H.; Jana, M.M.; Shirke, S.V.; Mascarenhas, A.F. Somatic embryogenic in some woody angiosperms. In: Jain, S.M.; Gupta, P.k.; Newton, R.J. (eds.), **Somatic embryogenesis in woody plants**, v.1, Dordrecht: Kluwer Academic

- Pu., p.23-48, 1995.
- Khlifi, S.; Tremblay, F.M. Maturation of black spruce somatic embryos. I. Effect of L-glutamine on the number and germinability somatic embryos. **Plant cell, tissue and organ culture**, n.41, p.23-32, 1995.
- Kirby, E.G. Leustek, T.; Lee, M.S. Nitrogen nutrition. In.: Bonga, J.M; Durzan, D. J. **Cell and Tissue culture in Forestry**. v.1, Dordrecht: Martinus Nijhoff Pu. p.67-88, 1987, 422p.
- Kitto, S. Janik, J. Production of synthetic seeds by encapsulating asexual embryos of carrot. **J. Am. Soc. HortScience**. v.110, p.277, 1985.
- Kiviharju, E.; Tuominen, U.; Törmälä, T. The effect of explant material on somatic embryogenesis of *Cyclamen persicum* Mill. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n.28, p.187-194, 1992.
- Komatsuda, T.; Kaneko, K.; Oka, S. Genotype x sucrose interactions for somatic embryogenesis in soybean. **Crop Science**, v.31, p.333, 1991.
- Lai, F.; Senaratna, T.; Mckersie, B.D. Glutamine enhances storage protein synthesis in *Medicago sativa* L. somatic embryos. **Plant Science**, n.87, p.69-77, 1992.
- Laurain, D.; Chénieux, J.-C.; Trémouillaux-Guiller, J. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Ginkgo biloba*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n.44, p.19-24, 1996.
- Lea, P.J. Nitrogen Metabolism. In.: Lea, P.J.; Leegood, R.C. **Plant Biochemistry and Molecular Biology**. New York: Wiley Sons Ltd. p.155-180, 1993.
- Legrand, C. D.; Klein, R.M. **Mirtáceas** In: REITZ, P.R. Flora Ilustrada Catarinense - Herbário "Barbosa Rodrigues", Itajaí-SC. p. 623-629, 1977.
- Lindsey, K.L.; Topping, J.F. Embryogenesis: a Question of Pattern. **Journal Experimental of Botany**. v. 44, n.259, p.359-374, 1993.
- Litz, R.E. *In vitro* responses of adventitious embryos of two polyembryonic *Eugenia* species. **HortScience**. n.19, p.720-722, 1984a.
- Litz, R.E. *In vitro* somatic embryogenesis from callus of jaboticaba, *Myrciaria caulifolia*. **HortScience**. n.19, p.62-64, 1984b.
- Lloyd, G.; McCown, B. Commercially-flasible micropropagation of mountain laurel, *kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Comb. proc. Intl. Plant prop. Soc.**, v.30, p.421-427, 1980.
- Mantell, S.H.; Matthews, J.A.; McKee, R.A. **Princípios de Biotecnologia em Plantas**. Uma introdução à engenharia genética em plantas. Ribeirão Preto: Editora FCA/ Sociedade Brasileira de Genética. 1994. 334 p.
- Matsumoto, T.K.; Webb, D.T.; Kuehnle, A.R. Histology and origin of somatic embryos derived from *Anthurium andraeanum* Linden ex André Lamina. **J. Amerc. Soc. Hort. Sci.** v.121, n.3, p.404-407, 1996.
- Mattos, J. R. **Goiabeira Serrana - Fruteiras nativas do Brasil**. 2 ed. Porto Alegre- RS. Ed. Gráfica Ceue, 1990, 120p.
- Mercke, S.A. Strategies for dealing with limitations of somatic embryogenesis in hardwood trees. **Plant Tissue Culture and biotechnology**. v.1, n.3, p.112-121, 1995.
- Mercke, S.A.; Parrott, W.A.; Flinn, B.S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: Torpe, T.A. (ed.), ***In vitro* embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.155- 203, 1995, 558 p.
- Mercke, S.A.; Wetzstein, H.Y.; Sommer, H.E. Somatic embryogenesis in tissue cultures of pecan. **HortScience**. n.22, p.128-130, 1987.

- Minocha, R.; Minocha, S. C.; Simola, L.K. Somatic embryogenesis and polyamines in woody plants. In: Jain, S.M.; Gupta, P.K.; Newton, R.J.(eds.), **Somatic embryogenesis in woody plants**, v.1 - History, molecular and biochemical aspects, and applications. Dordrecht: Kluwer Academic Pu. p.337-359, 1995.
- Minocha, S. C.; Minocha, R. Historical aspects of somatic embryogenesis in woody plants. In: Jain, S.M.; Gupta, P.K.; Newton, R.J.(eds.), **Somatic embryogenesis in woody plants**, v.1 - History, molecular and biochemical aspects, and applications. Dordrecht: Kluwer Academic Pu. p.9-22, 1995.
- Misra, S. Molecular analysis of zygotic and somatic conifer embryos. In: Jain, S.M.; Gupta, P.K.; Newton, R.J.(eds.), **Somatic embryogenesis in woody plants**, v.1 - History, molecular and biochemical aspects, and applications. Dordrecht: Kluwer Academic Pu. p.119-142, 1995.
- Morel, G.M.; Wetmore, R.H. Fern callus tissue culture. *Am. J. Bot.*, n.38 p.141-143, 1951.
- Muralidharam, E.M.; Mascarenhas, A.F. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus*. In: S.M. Jain; P.k. Gupta; R.J. Newton (eds.), **Somatic embryogenesis in woody plants**, v.2 - Angiosperms. Dordrecht: Kluwer Academic Pu., p. 23-40, 1995.
- Muralidharan, E.M.; Gupta, P.K.; Mascarenhas, A.F. Plantlet production through high frequency somatic embryogenesis in long term cultures of *Eucalyptus citriodora*. *Plant Cell Report*. n.8, p.41-43, 1989.
- Murashige, T. Plant cell and organ cultures as horticultural practices. *Acta Horticulturae*, v.78, p.17, 1977.
- Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physi. Plant.*, n.15, p.473-497, 1962.
- Neuman, M.C.; Preece, J.E.; Van Sambeek, J.W.; Gaffney, G.R. Somatic embryogenesis and callus production from cotyledon explants of Eastern black walnut (*Juglans nigra* L.). *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*, n.32, p.9-18, 1993.
- Nickle, T.C.; Yeung, E.C. Failure to establish a functional shoot meristem may be a cause of conversion failure in somatic embryos of *Daucus carota* (Apiaceae). *Am. J. Bot.* v.80, n.11, p. 1284-1291, 1993
- Niedz, R. P. Growth of Embryogenic Sweet Orange Callus on Media Varying in the Ratio of Nitrate to Ammonium Nitrogen. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. n.39, p.1-5, 1994.
- Nodari, R.O.; Guerra, M.P.; Meller, K.; Ducroquet, J.P. Genetic variability of *Feijoa sellowiana* germplasm. *Acta Horticulturae*, n.452, p.41-46, 1997.
- Nomura, K.; Komamine, A. Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE, T. A. (ed.) *In vitro embryogenesis in plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Pu. p.249-265, 1995.
- Onishi, N; Sakamoto, Y.; Hirokawa, T. Synthetic seeds as an application of mass production of somatic embryos. *Plant cell, tissue and organ culture*, n.39, p.137-145, 1994.
- Ozawa, K.; Ling, D.; Komamine, A. High-frequency somatic embryogenesis from small suspension-cultured clusters of cells of an interspecific hybrid of *Oryza*. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*, n.46, p.157-159, 1996.
- Pâques, M.; Bercetche, J.; Palada, M. Prospects and limits of somatic embryogenesis of *Pecea abies*. In: Jain, S.M.; Gupta, P.K.; Newton, R.J.(eds.), **Somatic embryogenesis in woody plants**, v.1 - History, molecular and biochemical aspects, and applications. Dordrecht: Kluwer Academic Pu. p.399-414, 1995.
- Parrot, W.A.; Bailey, M.A. Characterization of recurrent somatic embryogenesis of alfalfa on

- auxin-free medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. n.32, p.69-76, 1993.
- Pedroso, M.C.; Pais, N.S. Factors controlling somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. n.43, p.147-154, 1995.
- Pedrotti, E.L.; Jay-Allemand, C.; Doumas, P.; Cornu, D. Effect of autoclaving amino acids on *in vitro* rooting response of wild cherry shoot. *Scientia Horticulturae*, n.57, p.89-98, 1994.
- Pliego-Alfaro, F.; Monsalud, M.J.R.; Litz, R.E.; Gray, D.J.; Moon, P.A. Effect of abscisic acid, osmolarity and partial desiccation on the development of recalcitrant mango somatic embryos. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, n.44, p.63-70, 1996 a.
- Pliego-Alfaro, F.; Monsalud, M.J.R.; Litz, R.E.; Gray, D.J.; Moon, P.A. Effect of abscisic acid, osmolarity and temperature on *in vitro* development of recalcitrant mango nucellar embryos. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, n.44, p.53-61, 1996 b.
- Preece J.E.; Mcgranahan, G.H.; Long, L.M.; Leslie, C.A. Somatic embryogenesis in walnut (*Juglans regia*). In: Jain; S.M. Gupta, P.K.; Newton, R.J.(eds.), **Somatic embryogenesis in woody plants**, v.2 - Angiosperms. Dordrecht: Kluwer Academic Pu. p.99-116, 1995.
- Preece, J.E. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulators? *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, v. 1, n.1, p. 26-36, 1995.
- Pugliano, G. La Feijoa. *Frutticoltura*, v.42, n.9, p.51-54, 1980.
- Redenbaugh, K. Application of artificial seed to tropical crops. *HortScience*, v.25, n.3, p.251-255, 1990.
- Redenbaugh, K.; Fujii, J. A.; Slade, D. Encapsulated plant embryos. In: Mizrahi, A. (Ed.), **Biotechnology in agriculture**, New York: Alan R. Liss, Inc., v.9, p.225-248, 1988.
- Redenbaugh, K.; Nichol, J. Kossler, M.E.; Paasch, B. Encapsulation of somatic embryos for artificial seed production. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, v.20, p.256, 1984.
- Redenbaugh, K.; Paasch, B; Nichol, J.; Kossler, M.E.; Viss, P.; Walker, K.A. Somatic seeds: encapsulation of asexual plant embryos. *Bio/Technology*, v.4, p.797-801, 1986.
- Redenbaugh, K.; Slade, D. Viss, P. Fujii, J. A. Encapsulation of somatic embryos in synthetic seed coats. *HortScience*, v.22, n.5, p.803-809, 1987.
- Reinert, J. Morphogenese und ihre kontrolle an geweberkulturen aus karotten. *Naturwissenschaften*, n.45, p.344-345, 1958.
- Roberts, D.R. Abscisic acid and mannitol promote early development, maturation and storage protein accumulation in somatic embryos of interior spruce. *Physiol. Plant.* n.83, p.247-254, 1991.
- Roberts, D.R.; Sutton, B.C.S.; Flinn, B.S. Synchronous and high frequency germination of interior spruce somatic embryos following partial drying at high relative humidity. *Can. J. Bot.* n.68, p.1086-1090, 1990.
- Rock, C.D.; Quatrano, R.S. The role of hormones during seed development. In: Davies, P.J. (ed.), **Plant hormones**. Dordrecht: Kluwer Academic Pu., p.671-697, 1995.
- Ruffoni, B.; Massabó, F. Plant production by somatic embryogenesis in cell suspension cultures of *Lisianthus russellianus* Hook. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*. v.2, n.4, p.194-198. 1996.
- Salisbury, F.B.; Ross, C.W. **Fisiología Vegetal**. México: Grupo Ed. Iberoamérica. 1994, 759p.
- Santos, M.A.; Camara, T.; Rodriguez, P.; Claparols, I.; Torné, J.M. Influence of exogenous proline on embryogenesis and organogenic maize callus subjected to salt stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. n.47, p.59-65, 1996.

- Sass, I.E. **Botanical microtechnique**. IOWA, The Iowa State Coll. Preh. 1951.
- Schultheis, J.R.; Chée, R.P. Cantliffe, D.J. Embriões somáticos e sementes sintéticas. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S. (eds.) **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, p.227-249, 1990.
- Sharma, K.K.; Thorpe, T.A. Asexual embryogenesis in vascular plants in nature. In: THORPE, T. A. (ed.). **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Pu. p.17-72, 1995.
- Shoyama, Y.; Zhu, X.X.; Nakai, R.; Shiraishi, S.; Kohda, H. Micropropagation of *Panax notoginseng* by somatic embryogenesis and RAPD analysis of regenerated plantlets. **Plant Cell Reports**, n.16, p.450-453, 1997.
- Smith, D.L.; Krikorian, A D. Production somatic embryos from carrot tissue in hormone-free medium. **Plant Science** , n.58, p.103-110, 1988.
- Smith, D.L.; Krikorian, A D. Release of somatic embryogenesis potential from excised zygotic embryos of carrot and maintenance of proembryonic culture in hormone-free medium. **A. J. Bot.**, v.76, p.1832-1843, 1989.
- Smith, D.L.; Krikorian, A D. Somatic embryogenesis of carrot in hormone-free medium: external pH control over morphogenesis. **Am. J. Bot.**, v.77, n.12, p.1634-1647, 1990.
- Soh, R.R. La Feijoa. IPA, La Plantina, n. 31, p. 7-9, 1985.
- Sokal, R.R.; Rohlf, F.J. **Biometry** . 3ª. ed. New York, W.H. Freeman and Co. 1995, 881 p.
- Steel, R.G.D.; Torrie, J.H. **Principles and procedures of statistics - A biometrical approach**. 2. ed., New York: McGraw-Hill Book Co., 1980. 633p.
- Steward, F.C.; Mapes, M.O.; Mears, K. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures from freely suspended cells. **Am. J. Bot.** n.45, p.705-708, 1958.
- Stuart, D.A., Strickland, S.G. Somatic embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa* L. I. The role of amino acids addition to the medium. **Plant Science Lett.** n.34, p.165-174, 1984 a.
- Stuart, D.A., Strickland, S.G. Somatic embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa* L. II. The interaction of amino acids with ammonium. **Plant Science Lett.** n.34, p.175-181, 1984 b.
- Stuart, D.A., Strickland, S.G.; Walker, K.A. Bioreactor production of alfalfa somatic embryos. **HortScience**, v.22, p. 800, 1987.
- Szabados, L.; Mroginski, L.A.; Roca, W.M. Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones, In: Roca, W.M.; Mrogindty, L.A. (eds.), **Cultivo de tejidos en la agricultura**. Cali: CIAT, p.173-210, 1993.
- Taurus, T.E.; Attree, S.M.; Fowke, L.C.; Durzan, D.J. Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos, and embryo regeneration from protoplasts in black spruce (*Picea mariana* MILL.). **Plant Science**. n.67, p.115-124, 1990.
- Taurus, T.E.; Dunstan, D.I. Scale-up of embryogenic plant suspension cultures in bioreactors. In: Jain, S.M.; Gupta, P.K.; Newton, R.J.(eds.), **Somatic embryogenesis in woody plants**, v.1 - History, molecular and biochemical aspects, and applications. Dordrecht: Kluwer Academic Pu. p.266-292, 1995.
- Taurus, T.E.; Fowke, L.C.; Dunstan, D.I.. Somatic embryogenesis in Conifers. **Can. J. Bot.** n.69, p.1873-1899, 1991.
- Teixeira, J.B.; Söndahl, M.R.; Nakamura, T.; Kirby, E.G. Establishment of oil palm cell suspensions and plant regeneration. **Plant cell. tissue and organ culture**, n.40, p.105-

111, 1995.

- Thompson, R.G.; von Aderkas, P. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of western larch. *Plant cell reports*, n.11, p.379-385, 1992.
- Thorpe, T.A.; Harry, I.S.; Kumar P.P. Application of micropropagation to forestry. In: P.C. Debergh; R.H. Zimmerman (eds.) *Micropropagation - technology and application*. Dordrecht: Kluwer Academic Pu, p.311-336, 1991.
- Toonen, .M.A.J.; Hendriks, T. Schmidt, E.D.L.; Verhoeven, H.A.; van Kammen, A.; Vries, S.C. Description of somatic-embryo-forming sigle cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking. *Planta*, n.194, p.565-572, 1994.
- Toonen, .M.A.J.; Schmidt, E.D.L.; Vries, S.C. de. Cell tracking as a tool to study initial processes in somatic embryo development. *Plant Tissue Culture and Biotech.* v.2, n.1, p.3-10, 1996.
- Tremblay, L.; Tremblay, F. Effects of gelling agents, ammonium nitrate, and light on the development of *Picea rubens* Sarg. (red spruce) somatic embryos. *Plant Science.* n.77, p.233-242, 1991.
- Tulecke, W. Somatic Embryogenesis in Woody Perennials. In: Bonga, J.M; Durzan, D.J. *Cell and Tissue culture in Forestry.* v.2, Dordrecht: Martinus Nijhoff Pu. p.61-91, 1987.
- van der Linde, P.C.G. Hormone action and sensitivity: possible relation to aging. In: Rodrigues, R., Sanches, M., Tames, R., Durzan, D.J. (eds). *Plant Aging: Basic and Applied Approaches.* New York: Plenum Press, p. 285-292, 1990.
- van der Linde, P.C.G; Mennes, A.M. Modulation, purification and function of soluble auxin receptor. In: Rodrigues, R., Sanches, M., Tames, R., Durzan, D.J. (eds). *Plant Aging: Basic and Applied Approaches.* New York: Plenum Press, p.263-267, 1990.
- Vidor, M.A. *Micropropagación de Hyacinthus amethystina* cv. *albus*: estudios *morfogenéticos*. Madrid, UPM,1995. 253p. Tesis (Doctoral Ingeniero Agrónomo – Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, 1995).
- von Arnold, S. Improved efficiency of embryogenesis in mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst. *J. Plant Physiol.* n.128, p.233-244, 1987.
- Von Arnold, S.; Eriksson, T. A revised medium for growth of pea mesophyll protoplasts. *Physiol. Plant.* , n.39, p.257-260, 1977.
- von Arnold, S.; Eriksson, T. *In vitro* Studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. *Can. J. Bot.*, n.59. p.870-874, 1981.
- von Arnold, S.; Hakman, I. Effect of sucrose on initiation of embryogenic callus cultures from mature zygotic embryos of *Picea abies* (L.) Karst. (norway spruce). *J. Plant Physiol.*, n.122, p.261-265. 1986
- von Arnold, S.; Hakman, I. Plantlet regeneration *in vitro* via adventitious buds and somatic embryos in norway spruce (*Picea abies*). In: Hanover, J.W.; Keathley, D.E (eds.) *Genetic Manipulation of Wood Plants*, p.199-215, 1988.
- Walton, D.C.; Li, Y. Abscisic acid biosynthesis and metabolism. In: Davies, P.J. (ed.), *Plant hormones*. Dordrecht: Kluwer Academic Pu., p.140-157, 1995.
- Wetherell, D.F.; Dougall, D.K. Sources of of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. *Physiol. Plant.*, n.37, p.97-103, 1976.
- Williams, E.S.; Maheswaran, B. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. *Ann. Botany*, n.57, p.443-462, 1986.
- Wilson, D.P.M.; Sullivan, J.A.; Marsolais, A.A.; Tsujita, M.J.; Senaratna, T. Improvement of somatic embryogenesis in zonal geranium. *Plant cell, tissue and organ culture*, n.47,

p.27-32, 1996.

Yeung, E. C. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: Thorpe, T. A. (ed.). **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Pu. p.205-247, 1995.

Zimmerman, J.L. Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. **The Plant Cell**. v.5, p.1411-1423, 1993.