

EFEITOS DA GLUTATIONA E DA FONTE DE CARBONO NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE *ACCA SELLOWIANA* (O.BERG) BURRET

Ana Flávia Pavei¹, Hugo Pacheco de Freitas Fraga¹, Leila do Nascimento Vieira¹, Miguel Pedro Guerra^{1*}

¹Universidade Federal de Santa Catarina. *E-mail do autor para correspondência: miguel.guerra@ufsc.br

Resumo

No presente trabalho avaliou-se o efeito de diferentes concentrações (0, 0,1, 0,5 e 1 mM) de glutatona (GSH) na indução da embriogênese somática (ES) em *A. sellowiana*. Adicionalmente, foram avaliadas diferentes fontes de carbono (sacarose e maltose) suplementadas ao meio de cultura para conversão de embriões somáticos em plântulas. Os tratamentos com GSH promoveram maiores taxas de indução da ES (~70%) comparado ao controle sem GSH (~36%) aos 50 dias de cultivo. Aos 80 dias de cultivo não houve diferença estatística quanto à porcentagem de indução. O número total de embriões somáticos não diferiu entre os tratamentos testados, mas sim quanto aos estágios embrionários avaliados. Aos 80 dias, o tratamento com 0,5 mM de GSH resultou num maior número de embriões no estágio de torpedo, enquanto o tratamento com 1 mM de GSH resultou em maior número de embriões no estágio torpedo, seguido por cordiforme. Diferentemente, os tratamentos com 0 e 0,1 mM de GSH apresentaram quantidades iguais de embriões em todos os estágios embrionários. Os resultados indicam que a suplementação com GSH acelera o processo de indução da ES e aumenta a sincronia na formação de embriões somáticos de *A. sellowiana*. O uso de maltose na conversão de embriões somáticos em plântulas em comparação com sacarose não apresenta influência na taxa de conversão de embriões somáticos normais, mas sim quanto à taxa de embriões aclorofilados, os quais ocorrem em maior porcentagem no tratamento com maltose. Este fato pode ser atribuído à rápida hidrólise da sacarose, apresentando translocação na planta mais eficiente e aumento da osmolaridade do meio de cultura, contribuindo para a maior síntese de clorofila. Como o total de embriões anormais e aclorofilados não diferiu entre os tratamentos, é recomendável o uso da sacarose por apresentar baixo custo e fácil acessibilidade.

Palavras-chave: goiabeira serrana, embriogênese somática, glutatona, fontes de carbono.

EFFECTS OF GLUTATHIONE AND THE CARBON SOURCE IN THE SOMATIC EMBRYOGENESIS OF *Acca sellowiana* (O.BERG) BURRET

Abstract

In the present work the effect of different concentrations (0, 0.1, 0.5 e 1 mM) of glutathione (GSH) on somatic embryogenesis (SE) induction in *A. sellowiana* was evaluated. In addition, different carbon sources (sucrose and maltose) supplemented to the culture medium were compared for somatic embryo conversion into plantlets. GSH-supplemented treatments improved SE induction rates (~70%) as compared to the control GSH-free (~36%) at 50 days in culture. At 80 days in culture there was no statistical difference regarding the induction rate. The total number of somatic embryos did not differ between the treatments, but rather differ about embryo developmental stages. At 80 days, 0.5 mM GSH treatment resulted in a larger number of torpedo-staged somatic embryos, whereas treatment with 1 mM GSH resulted in a larger number of torpedo-staged somatic embryos, followed by heart-staged. Differently, treatments supplemented with 0 and 0.1 mM GSH showed equal amounts of embryos at all embryonic stages. The results indicate that GSH accelerates the SE induction process and increases the synchrony in the somatic embryo formation of *A. sellowiana*. The use of maltose in the somatic embryos conversion in comparison with sucrose does not influenced the conversion rate of normal somatic embryos, but rather the rate of non-chlorophyll embryos, which occur in a higher percentage in maltose-supplemented treatment. This fact can be attributed to the rapid hydrolysis of sucrose, presenting more efficient plant translocation and increased culture medium osmolarity, and contributing to an enhanced chlorophyll synthesis. As the total of abnormal and non-chlorophyll embryos did not differ between treatments, the use of sucrose is advisable because it presents low cost and easy accessibility.

Key words: pineapple-guava, somatic embryogenesis, glutathione, carbon source.

1. Introdução

A *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret (Myrtaceae), conhecida como feijoa ou goiabeira serrana (Figura 1), é uma planta nativa da Mata Atlântica, com ocorrência nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, e dispersão secundária no Uruguai

(GUERRA et al., 2013). É uma espécie típica de sub-bosque de formações de estágio avançado da Floresta Ombrófila Mista, em altitudes acima de 1000 metros (FINATTO et al., 2011).

Essa espécie possui um grande potencial econômico a ser explorado em regiões de alta altitude do país, devido ao alto valor de mercado de seus frutos e flores, sendo uma frutífera atrativa principalmente para agricultores familiares. A expansão de sua produção possibilitaria o processamento dos frutos na forma de sucos, fermentados, destilados, sorvetes, frutas cristalizadas, produtos com alto valor agregado (RUBERTO & TRINGALI, 2004; VUOTTO et al., 2000; BEYHAN et al., 2010; WESTON, 2010). Além disso, é uma espécie de importância para a recuperação de áreas degradadas (GOMES et al., 2016), matas ciliares, áreas de preservação permanente, reservas legais e para compor Sistemas Agro-Florestais (DO SANTOS, 2014).

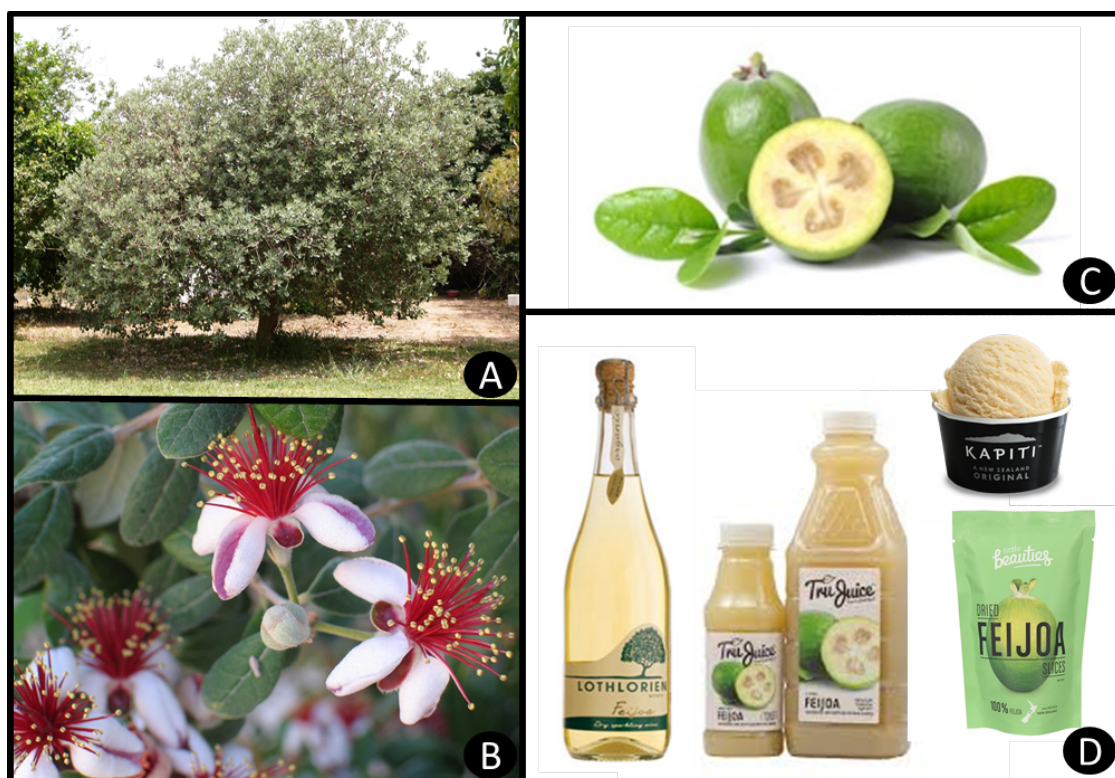


Figura 1. Aspectos da *A. sellowiana*. A) Planta adulta. B) Flores e folhas. C) Frutos. D) Produtos derivados do processamento dos frutos.

Fonte: A) <http://www.wikiwand.com/hr/Acca_sellowiana> B) <<http://swbiodiversity.org/seinet/taxa/index.php?taxon=33113>> C) <<http://thekiwihaslanded.com/fejjoa/>> D) Espumante: <<http://www.topshelfliquor.co.nz/estore/style/9414453650155.aspx#.WCsYuPorLIU>> Sucos: <<http://www.nzjuice.co.nz/tru-juice/>> Sorvete: <<https://www.fonterrafoodservice.co.nz/product/kapiti-feijoa-ice-cream>> Frutas secas: <<https://www.ballantynes.co.nz/>>

Apesar de ser uma espécie nativa da América Latina, o seu cultivo é predominante em países, tais como a Nova Zelândia, a Colômbia e a Turquia (GUERRA et al., 2016), e o aumento do cultivo no Brasil está condicionado ao aperfeiçoamento de técnicas de propagação e difusão de tecnologias para a agricultura familiar.

A *A. sellowiana* pode ser propagada através de sementes, estaquia, enxertia ou micropropagação (GOMES et al., 2015). Técnicas de cultura de tecidos, principalmente associadas à embriogênese somática (ES), possuem a vantagem de permitir a micropropagação massal e clonal de genótipos selecionados desta espécie (GUERRA et al., 1999). A ES é um processo análogo à embriogênese zigótica e se baseia na totipotência das células vegetais de formarem embriões a partir de células somáticas. Esta técnica tem sido estudada e aperfeiçoada nas últimas duas décadas no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal do CCA/UFSC, porém as etapas de maturação e conversão dos embriões somáticos obtidos ainda apresentam baixas taxas, necessitando de aprimoramento.

A γ -glutamilcisteinilglicina ou glutathiona (GSH – forma reduzida) é um tripeptídeo tiólico envolvido no processo de divisão e diferenciação celular, com efeito sobre a indução e controle da ES em várias espécies de plantas (BELMONTE et al., 2005; VIEIRA et al., 2012; CAPRESTANO et al., 2015; FRAGA et al., 2016). O GSH adicionado durante os estágios iniciais da ES cria um estado reduzido no meio de cultura favorável ao processo, intensificando a proliferação celular e a formação de embriões somáticos imaturos (Stasolla, 2010).

Em *Araucaria angustifolia*, a suplementação de GSH no meio de cultura aumentou a formação de embriões somáticos na fase inicial de desenvolvimento, relacionado à manipulação de concentrações de óxido nítrico (VIEIRA et al., 2012). Similarmente, em *Cyclamen persicum*, a suplementação de GSH na concentração de 4 mM promoveu aumento na formação de embriões somáticos durante os primeiros 14 dias de diferenciação, consistindo em um efeito genótipo-dependente (CAPRESTANO et al., 2015). A adição de GSH no meio de cultura aumentou o número de embriões somáticos de *Podocarpus lambertii* no estágio de maturação, além de melhorar características morfológicas (FRAGA et al., 2016).

Carboidratos participam das rotas de indução e regeneração de embriões somáticos. A principal fonte de carbono descrita na literatura para a conversão de embriões somáticos em plântulas de *A. sellowiana* é a sacarose, pela fácil disponibilidade e preço acessível. Um

carboidrato alternativo, mas de custo mais elevado, é a maltose. Em *A. angustifolia* o uso de maltose como fonte de carbono promoveu maior organização na diferenciação dos tecidos embrionários, o que foi atribuído a sua lenta hidrólise (STEINER et al., 2005). Não há relatos na literatura do uso desse açúcar na conversão de embriões somáticos de *A. sellowiana* em plântulas, o que pode ser uma estratégia interessante para obter uma maior taxa de plântulas normais.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de GSH na indução de ES em *A. sellowiana* e comparar diferentes fontes de carbono (sacarose e maltose) suplementadas ao meio de cultura para conversão de embriões somáticos em plântulas.

2. Material e métodos

2.1. Obtenção de material vegetal e desinfestação dos explantes

Frutos de *A. sellowiana* do acesso 101 oriundos da coleção de germoplasma da Estação Experimental da EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural) de São Joaquim foram coletados e transportados para o Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina. As sementes foram extraídas e desinfestadas em câmara de fluxo laminar com etanol (70 %) por 1 minuto e hipoclorito de sódio (2 %) por 20 minutos, e posteriormente passaram por uma tríplice lavagem com água deionizada esterilizada, segundo a metodologia descrita por Guerra et al. (2001).

2.2. Indução de embriogênese somática

Embriões zigóticos maduros foram excisados e incubados em solução com 2,4-diclorofenoxiacético (200 μ M) por 1 hora, de acordo com Caprestano (2010) e Fraga et al. (2012) e em seguida inoculados em placa de Petri contendo 25 ml de meio de cultura LPm (VON ARNOLD & ERIKSSON, 1981), suplementado com vitaminas de Morel (MOREL & WETMORE, 1951), maltose (30 g L⁻¹), ácido glutâmico (1,35 g L⁻¹). Neste estágio, diferentes concentrações de GSH (0, 0,1, 0,5 e 1 mM) foram testados, consistindo em 4 tratamentos. O pH do meio foi ajustado para 5,8, geleificado com Phytigel[®] (2 g L⁻¹) e

autoclavado a 121°C por 15 minutos. As culturas foram mantidas na ausência de luz a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ em estufa tipo B.O.D.

O delineamento experimental foi completamente casualizado, com 4 tratamentos e 6 repetições e cada unidade amostral correspondeu à 5 embriões zigóticos. Foram avaliadas a porcentagem de indução da ES aos 50 e 80 dias e o número de embriões em cada estágio de desenvolvimento aos 80 dias de cultivo.

Para porcentagem de indução, os dados obtidos foram submetidos à análise de qui-quadrado a 5% de probabilidade, e para número de embriões em diferentes estágios de desenvolvimento, foi realizada análise de variância seguida por teste de separação de médias SNK a 5% de probabilidade.

2.3. Conversão de embriões somáticos em plântulas

Embriões somáticos em estágio torpedo e pré-cotiledonar foram selecionados, isolados e transferidos para placas de Petri contendo 25 ml de meio de cultura para conversão em plântulas. A formulação salina utilizada foi o LPM (VON ARNOLD & ERIKSSON, 1981), suplementado com vitaminas de Morel (MOREL & WETMORE, 1951), ácido glutâmico ($1,35 \text{ g L}^{-1}$), e complementado segundo a metodologia de Caprestano (2010) por ácido giberélico ($1 \mu\text{M}$), fluridone ($0,05 \mu\text{M}$), 6-benzilaminopurina ($0,5 \mu\text{M}$), carvão ativado ($1,5 \text{ g L}^{-1}$), sendo testadas duas diferentes fontes de carbono: sacarose ou maltose (30 g L^{-1}). O pH do meio foi ajustado para 5,8, geleificado com Phytigel[®] (2 g L^{-1}) e autoclavado a 121°C por 15 min. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e 16h de luz fornecida por lâmpadas tubulares LED brancas e intensidade luminosa de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

O delineamento experimental foi em blocos completamente casualizados, com 2 tratamentos e 8 repetições, com cada unidade amostral consistindo de em média 30 embriões somáticos. Foram avaliados o número de embriões convertidos em plântulas normais clorofiladas, normais aclorofiladas e anormais após 4 semanas. Foram consideradas plântulas normais as que apresentavam dois cotilédones, protrusão de radícula e presença de clorofila. Os dados foram submetidos à análise de variância seguida por teste de separação de médias SNK a 5% de probabilidade.

3. Resultados e discussão

3.1. Efeito de diferentes concentrações de GSH na indução de ES em *A. sellowiana*

Os tratamentos com suplementação de GSH indicaram maiores taxas de indução da ES (~70%) comparado ao controle sem GSH (~36%) aos 50 dias de cultivo, não havendo diferença estatística entre os tratamentos com suplementação de GSH. Aos 80 dias de cultivo não houve diferença estatística quanto à porcentagem de indução (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem de indução de embriões somáticos de *A. sellowiana* aos 50 e 80 dias de cultivo em resposta à diferentes concentrações de GSH.

Tratamentos	Indução (%)	
	50 dias	80 dias
GSH 0 mM	36,67 b	56,67 a
GSH 0,1 mM	70,00 a	70,00 a
GSH 0,5 mM	66,67 a	73,33 a
GSH 1 mM	76,67 a	80,00 a

Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si segundo teste de χ^2 a 5% de probabilidade.

Fraga et al. (2016) realizaram experimentos com diferentes concentrações de GSH (0, 0,1 e 0,5 mM) durante a fase inicial de maturação de culturas embriogênicas de *Podocarpus lambertii* e obtiveram maior taxa de formação de embriões somáticos na concentração de 0,5 mM de GSH aos 10 dias. Os resultados destes autores estão de acordo com aqueles encontrados no presente trabalho, sugerindo que o GSH acelera o processo de formação de embriões somáticos em *A. sellowiana*.

Vieira et al. (2012) obtiveram um aumento na formação de embriões somáticos de *A. angustifolia* em estágio inicial em meio de cultura suplementado com baixas concentrações de GSH (0,01 e 0,1 mM). Porém, quando as culturas embriogênicas foram mantidas no mesmo meio de cultura por mais de sete dias de cultivo, houve uma queda de polarização e redução de embriões normais.

O número total de embriões somáticos não diferiu entre os tratamentos testados, mas sim quando analisados separadamente os estágios embrionários (Tabela 2 e Figura 2). Aos 80 dias (Figura 2), o tratamento com 0,5 mM de GSH resultou num maior número de embriões no estágio de torpedo, enquanto o tratamento com 1 mM de GSH resultou em

maior número de embriões no estágio torpedo, seguido por cordiforme. Diferentemente, os tratamentos com 0 e 0,1 mM de GSH apresentaram quantidades iguais de embriões em todos os estágios embrionários.

Tabela 2. Número total de embriões somáticos de *A. sellowiana* nos diferentes estágios de desenvolvimento embrionário formados em diferentes concentrações de GSH.

Tratamento	Estágio embrionário				CV (%)
	Globular	Cordiforme	Torpedo	Cotiledonar	
GSH 0 mM	233 a	131 a	125 a	55 a	111,91
GSH 0,1 mM	337 a	209 a	343 a	55 a	78,59
GSH 0,5 mM	88 b	96 b	239 a	58 b	69,81
GSH 1 mM	36 c	172 b	302 a	78 bc	57,38

Médias seguidas da mesma letra nas linhas não diferem significativamente entre si segundo teste SNK a 5% de probabilidade.

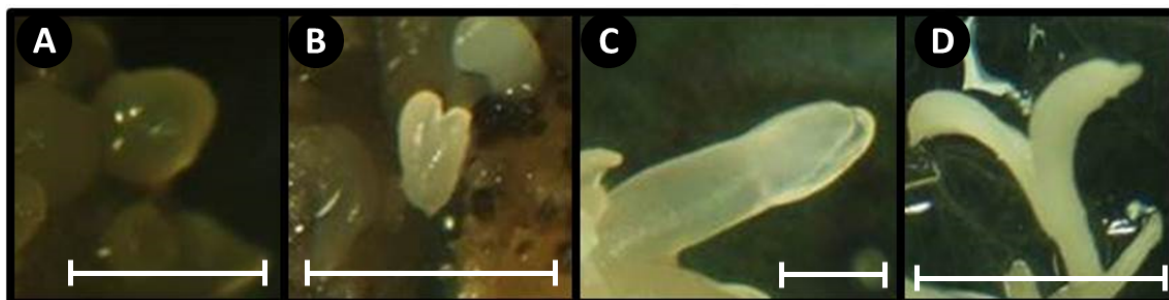


Figura 2. Aspectos morfológicos de embriões somáticos de *Acca sellowiana* em diferentes estágios de desenvolvimento. Figura A: embrião somático globular, barra: 50 µm. Figura B: embrião somático cordiforme, barra: 50 µm. Figura C: embrião somático torpedo, barra: 50 µm. Figura D: embrião somático cotiledonar, barra: 5 mm.

Esses resultados indicam que a suplementação com GSH, além de acelerar o processo de indução da ES, aumenta a sincronia na formação de embriões somáticos de *A. sellowiana*, aumentando o número de embriões somáticos em estágios mais avançados. Similarmente, a suplementação de GSH em meio de cultura na fase de maturação aumentou o número e a qualidade de embriões somáticos de *Podocarpus lambertii* (FRAGA et al., 2016). Em *Picea glauca*, a adição de GSH no meio de cultura de maturação aumentou a taxa de conversão de embriões somáticos, e os autores relacionam este resultado à expressão de genes relacionados ao desenvolvimento embrionário e alterações morfológicas durante o estágio de maturação (STASOLLA et al., 2004).

A manipulação da taxa de GSH/GSSG (glutathiona dissulfeto) durante o processo final de maturação pode ser uma estratégia interessante para melhorar a taxa de embriões normais em estágio de maturação (STASOLLA, 2010; FRAGA et al., 2016). De acordo com Stasolla (2010), a transferência de embriões somáticos no estágio de maturação para meio de cultura oxidado com a suplementação de GSSG favorece a diferenciação de tecidos e a maturação dos embriões somáticos.

Em experimentos com *Picea glauca*, foi observado um aumento na indução da ES em meio de cultura suplementado com 0,1 mM de GSH, e quando os embriões foram transferidos para meio de cultura suplementado com GSSG para maturação, o número de embriões somáticos em estágio cotiledonar foi superior em comparação ao tratamento sem GSSG (BELMONTE & YEUNG, 2004; BELMONTE et al., 2005). Similarmente, Pullman et al. (2014) obteve um aumento de embriões somáticos maduros de *Pinus taeda* em meio de cultura suplementado com GSSG.

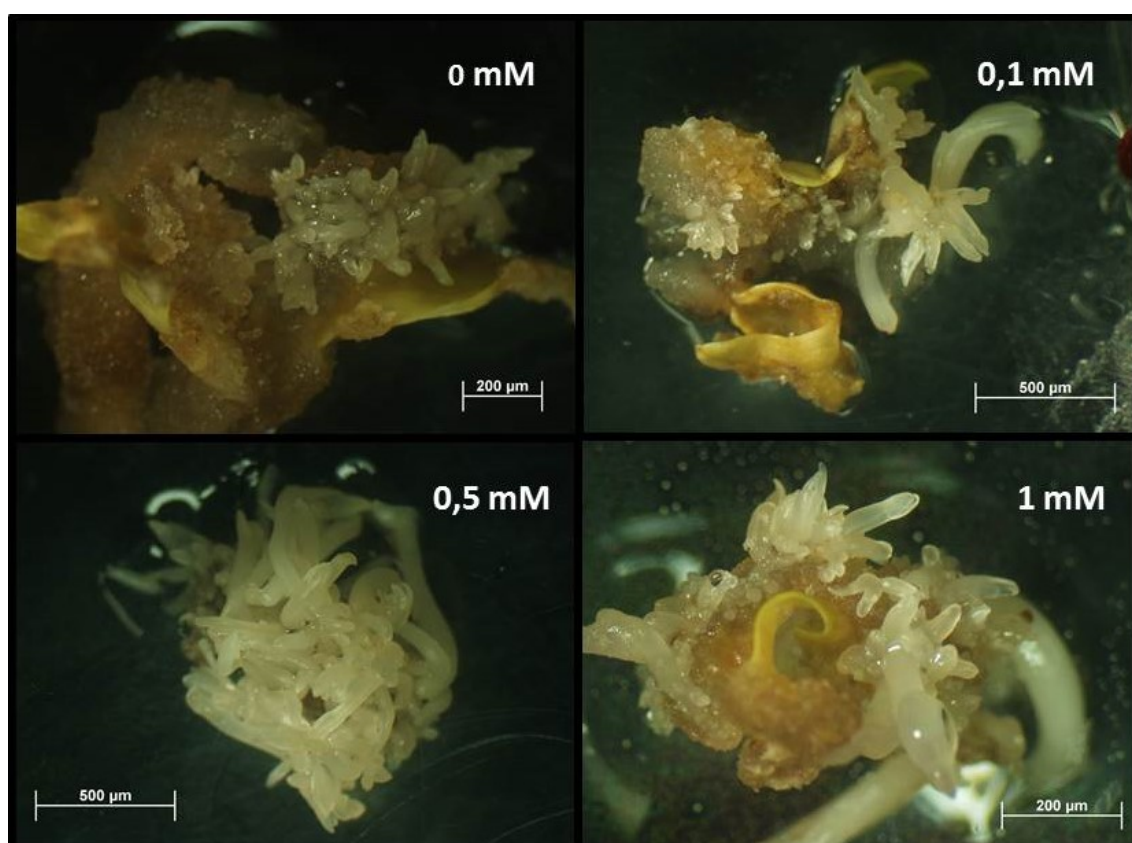


Figura 3. Culturas embriogênicas de *Acca sellowiana* contendo embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento em meio de cultura suplementado com 0, 0,1, 0,5 e 1 mM de GSH após 80 dias de cultivo.

3.2. Efeito da suplementação com sacarose e maltose durante a conversão de embriões somáticos de *A. sellowiana*

Foi obtida uma porcentagem de conversão de plântulas total de 20,84% (Tabela 3), o que equivale aos resultados de trabalhos encontrados na literatura para esta espécie, variando entre 20 e 35% (CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2007; CAPRESTANO, 2010; FRAGA et al., 2012).

Foram obtidas porcentagens de embriões somáticos convertidos em plântulas normais de 23,02% e de 18,58%, respectivamente, em resposta aos tratamentos com sacarose e maltose.

Tabela 3. Média e total de embriões somáticos normais, aclorofilados e anormais totais de *Acca sellowiana* convertidos em plântulas nos diferentes tratamentos.

Tratamento	Embriões convertidos em plântulas (%)			
	Clorofilados Normais	Aclorofilados Normais	Anormais	Aclorofilados + anormais
Sacarose	23,02 a	10,94 b	34,55 a	45,32 a
Maltose	18,58 a	19,47 a	29,60 a	48,93 a
Total	20,84	15,05	32,08	47,13
CV (%)	25,46	45,32	37,67	25,17

Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si segundo teste SNK a 5% de probabilidade.

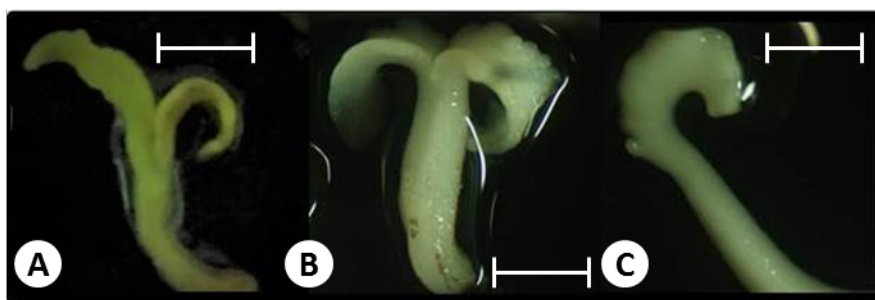


Figura 4. Aspectos morfológicos de plântulas de *Acca sellowiana*. Figura A: plântula normal, barra: 1 mm. Figura B: plântula aclorofilada, barra: 1 mm. Figura C: plântula anormal, barra: 1 mm.

Diferentes fontes de carbono, incluindo maltose e sacarose, foram avaliadas no meio de cultura para conversão de embriões somáticos de *Catharanthus roseus* em plântulas. Os melhores resultados foram obtidos com 3-6% de sacarose ou 3% de frutose (JUNAID et al., 2006). Em contraste, o maior número de embriões somáticos maduros de *Ahirs nordmanniana* e a maior porcentagem de conversão de plântulas foram obtidos em meio suplementado com maltose, em comparação com sacarose (NORGAARD, 1997). Similarmente em comparação com sacarose, foi obtido um maior número de embriões maduros de *Castanea sativa* e convertidos em plântulas em meio de cultura suplementado com maltose (CORREDOIRA et al., 2003).

No presente trabalho não foi observada diferença estatística entre os tratamentos para porcentagem total de embriões anormais e aclorofilados, indicando que o uso de maltose ao invés de sacarose não interfere na taxa de embriões anormais. Porém, quando avaliado o número de embriões anormais devidos apenas à ausência de clorofila, o tratamento com suplementação de maltose resultou em maiores taxas (19,47% em comparação á 10,94%). Esses resultados sugerem que a maltose possa ter um efeito sobre a organização e diferenciação dos tecidos embrionários no estágio de conversão em plântulas, considerando que o tratamento com sacarose obteve uma maior taxa de embriões anormais (34,55% em comparação á 29,60%), ou seja, embriões com apenas um cotilédone, ausência de cotilédones, cotilédones fusionados, dentre outras anormalidades. Entretanto, não foi obtida diferença estatística entre os tratamentos para essa característica devido à alta variação ambiental.

O efeito da maltose na taxa de formação de embriões somáticos anormais já foi descrita para algumas espécies, porém não há estudos relacionados à fase de conversão dos embriões em plântulas. O efeito benéfico da maltose na diferenciação de tecidos de culturas embriogênicas poderia ser atribuído ao baixo fornecimento de hexoses e sua lenta hidrólise (Blanc et al., 2002). Em *A. angustifolia* a maltose favoreceu a indução de proembriões com eixos polares bem desenvolvidos, o que também foi atribuído a sua lenta hidrólise, promovendo maior organização na diferenciação dos tecidos embrionários (STEINER et al., 2005). Diferentemente, a sacarose sofre rápida hidrólise e as células se proliferam em maior velocidade, formando um maior número de embriões anormais.

Não há relatos na literatura sobre inibição de formação de clorofila devido à maltose, e de acordo com Thorpe et al. (2008), açúcares não inibem a síntese de clorofila, com exceção da sacarose em altas concentrações. No presente trabalho, a maior

porcentagem de plântulas clorofiladas em resposta ao tratamento com sacarose pode ser explicada por esta apresentar translocação na planta mais eficiente, constituindo a fonte de carbono de maior importância para os tecidos não fotossintéticos e para a respiração vegetal (TAIZ & ZEIGER, 2009).

Além de serem fontes de carbono, os açúcares também agem como reguladores osmóticos no meio de cultura, o que também pode ter efeito sobre a porcentagem de plântulas clorofiladas. Em experimento de conversão de embriões somáticos de trigo, Zhou et al. (1991) observaram maior número de plântulas clorofiladas no tratamento de sacarose em comparação com maltose. Os autores atribuíram esse resultado ao aumento da osmolaridade do meio de cultura no tratamento de sacarose, devido à rápida hidrólise e conversão em frutose e glicose.

4. Conclusões

A suplementação de GSH ao meio de cultura acelera o processo de indução da ES e aumenta a sincronia na formação de embriões somáticos de *A. sellowiana*. O uso de maltose na conversão de embriões somáticos em plântulas em comparação com sacarose não apresenta efeitos adicionais na taxa de conversão de embriões somáticos normais, mas sim quanto à taxa de embriões aclorofilados, a qual é maior em resposta ao tratamento com maltose. Como o total de embriões anormais e aclorofilados não difere é recomendável o uso da sacarose por apresentar baixo custo e fácil acessibilidade.

Como perspectivas futuras, a manipulação de GSH/GSSG pode ser uma estratégia apropriada para melhorar a ES nesta espécie. Além disso, o uso de outras fontes de carbono e em diferentes concentrações é visto como uma possibilidade para melhorar a taxa de conversão de embriões somáticos em plântulas para esta espécie.

5. Referências bibliográficas

ARNOLD, S. V. & ERIKSSON, T. In vitro studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. **Canadian Journal of Botany**, v. 59, n. 5, p. 870-874, 1981.

BELMONTE, M. F., DONALD, G., REID, D. M., YEUNG, E. C., & STASOLLA, C. . Alterations of the glutathione redox state improve apical meristem structure and somatic embryo quality in white spruce (*Picea glauca*). **Journal of experimental botany**, v. 56, n. 419, p. 2355-2364, 2005.

BEYHAN O.; ELMASTAŞ, M.; GEDIKLI F. Total phenolic compounds and antioxidant capacity of leaf, dry fruit and fresh fruit of feijoa (*Acca sellowiana*, Myrtaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 11, p. 1065-1072, 2010.

BLANC, G., LARDET, L., MARTIN, A., JACOB, J. L., & CARRON, M. P. (2002). Differential carbohydrate metabolism conducts morphogenesis in embryogenic callus of *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.). **Journal of Experimental Botany**, 53(373), 1453-1462.

CANGAHUALA-INOCENTE, Gabriela Claudia et al. Improvements in somatic embryogenesis protocol in Feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Burret): induction, conversion and synthetic seeds. **Scientia Horticulturae**, v. 111, n. 3, p. 228-234, 2007.

CAPRESTANO, Clarissa Alves. **Embriogênese somática em *Acca sellowiana*: avanços na indução e conversão**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis.

CAPRESTANO, C. A.; GUERRA, M. P.; WINKELMANN, T. Effect of glutathione on the early differentiation of *Cyclamen persicum* somatic embryos. **DGG-Proceedings**, v. 5, p. 12-5, 2015.

CORREDOIRA, E.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, A. M. Proliferation, maturation and germination of *Castanea sativa* Mill. somatic embryos originated from leaf explants. **Annals of Botany**, v. 92, n. 1, p. 129-136, 2003.

DOS SANTOS, Hellen Aparecida Arantes. **Dinâmica populacional de moscas-das-frutas associadas a feijoa (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret) em diferentes habitats e sua implicação no manejo de pragas**. 2014. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina.

FINATTO, T.; SANTOS, K. L.; STEINER, N.; BIZZOCCHI, L.; HOLDERBAUM, D. F.; DUCROQUET, J. P. H. J.; GUERRA, M. P.; NODARI, R.O. Late-acting self-incompatibility in *Acca sellowiana* (Myrtaceae). **Australian Journal of Botany**, Collingwood, v.59, n.1, p.53-60, 2011.

FRAGA, H. P. F.; VIEIRA, L. N.; CAPRESTANO, C. A.; STEINMACHER, D. A.; MICKE, G.A.; SPUDEIT, D. A.; PESCADOR, R.; GUERRA, M. P. 5-Azacytidine combined with 2,4-D improves somatic embryogenesis of *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret by means of changes in global DNA methylation levels. **Plant Cell Reports** (Print), v. 31, p. 2165-2176, 2012.

FRAGA, H. P. F.; VIEIRA, L. N.; PUTTKAMMER, C. C.; SANTOS, H. P.; GARIGHAN, J. ; GUERRA, M. P. Glutathione and abscisic acid supplementation influences somatic embryo maturation and hormone endogenous levels during somatic embryogenesis in *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex Endl.. **Plant Science** (Limerick), v. 253, p. 98-106, 2016.

GUERRA, M. P.; CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; VESCO, L. L. D.; PESCADOR, R.; CAPRESTANO, C. A. Micropropagation Systems of Feijoa (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret). **Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants**, p. 45-62, 2013.

GUERRA M.P.; DAL VESCO L. L. D.; DUCROQUET J.P.H.; NODARI R.O.; REIS M.S. Somatic embryogenesis in Goiabeira serrana: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 2, p. 117-128, 2001.

GUERRA, M. P.; FRAGA, H. P. F.; VIEIRA, L. N.; REE, J. F.; HERINGER, A. S.; MALDONADO, S. B. Fundamentals, advances and applications of somatic embryogenesis in selected Brazilian native species. **XXIX International Horticultural Congress on Horticulture: Sustaining Lives, Livelihoods and Landscapes (IHC2014)**: 1113. 2016.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogenese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (eds.), **Cultura de tecidos e transformação genética em plantas**, v. 2, Brasília: EMBRAPA-SPI, p.533-568, 1999.

GOMES, J. P.; DE OLIVEIRA, L. M.; FERREIRA, P. I.; BATISTA, F. Substratos e temperaturas para teste de germinação em sementes de myrtaceae. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 1, p. 285-293, 2016.

JUNAID, A.; MUJIB, A., BHAT, M. A.; SHARMA, M. P. Somatic embryo proliferation, maturation and germination in *Catharanthus roseus*. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 84, n. 3, p. 325-332, 2006.

MOREL, G.; WETMORE, R.H. Tissue culture of monocotyledons. **American Journal of Botany**, v.38, p.138-140, 1951.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962. Netherlands. pp. 282-283, 585 p., 1999.

NORGAARD, Jens Viktor. Somatic embryo maturation and plant regeneration in *Abies nordmanniana* Lk. **Plant Science**, v. 124, n. 2, p. 211-221, 1997.

PULLMAN, G. S.; ZENG, X., COPELAND-KAMP, B.; CROCKETT, J.; LUCREZI, J.; MAY, S. W.; BUCALO, K.. Conifer somatic embryogenesis: improvements by supplementation of medium with oxidation–reduction agents. **Tree physiology**, p. tpu117, 2015.

RUBERTO G. & TRINGALI C. Secondary metabolites from the leaves of *Feijoa sellowiana* Berg. **Phytochemistry**, v. 65, n. 21, p. 2947-2951, 2004.

STASOLLA, Claudio. Changes in the glutathione and ascorbate redox state trigger growth during embryo development and meristem reactivation at germination. In: **Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants**. Springer Netherlands, 2010. p. 231-249.

STASOLLA, Claudio. Glutathione redox regulation of in vitro embryogenesis. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 5, p. 319-327, 2010.

STASOLLA, C.; BELMONTE, M. F.; VAN ZYL, L.; CRAIG, D. L.; LIU, W., YEUNG, E. C.; SEDEROFF, R. R. The effect of reduced glutathione on morphology and gene expression of white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. **Journal of experimental botany**, v. 55, n. 397, p. 695-709, 2004.

STEINER, N.; VIEIRA, F. D. N.; MALDONADO, S.; GUERRA, M. P. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Brazilian archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 6, p. 895-903, 2005.

THAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal** – 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848p.

THORPE, T.; STASOLLA C.; YEUNG, E.C.; KLERK, de G-J.; ROBERTS, A.; GEORGE, E.F. **The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems**. In: George, E.F.; Hall, M.A.; KLERK de G-J (edt.). *Plant propagation by tissue culture – volume 1. The background* – 3. ed. – Dordrecht: Springer, 2008. pp. 105-176.

VIEIRA, L. N.; SANTA-CATARINA, C.; FRAGA, H.P. de F.; DOS SANTOS, A.L.W.; STEINMACHER D.A.; SCHLOGL, P.S.; SILVEIRA, V.; STEINER N.; FLOH, E.I.S.; GUERRA, M.P. Glutathione improves early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Kuntze by alteration in nitric oxide emission. **Plant science**, v. 195, p. 80-87, 2012.

VUOTTO, M. L.; BASILE, A.; MOSCATIELLO, V.; DE SOLE, P.; CASTALDO-COBIANCHI, R.; LAGHI, E.; IELPO, M. T. L. Antimicrobial and antioxidant activities of *Feijoa sellowiana* fruit. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 13, n. 3, p. 197-201, 2000.

WESTON, Roderick J. Bioactive products from fruit of the feijoa (*Feijoa sellowiana*, Myrtaceae): A review. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 923-926, 2010.

ZHOU, H.; ZHENG, Y.; KONZAK, C. F. Osmotic potential of media affecting green plant percentage in wheat anther culture. **Plant cell reports**, v. 10, n. 2, p. 63-66, 1991.