

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS**

Clarissa Alves Caprestano

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Acca sellowiana*: AVANÇOS
NA INDUÇÃO E CONVERSÃO.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração em Recursos Genéticos Vegetais.
Orientador: Miguel Pedro Guerra

Florianópolis
2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

C252e Caprestano, Clarissa Alves
Embrionogênese somática em *Acca sellowiana* [dissertação] :
avanços na indução e conversão / Clarissa Alves Caprestano ;
orientador, Miguel Pedro Guerra. - Florianópolis, SC, 2010.
99 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos genéticos vegetais. 2. Goiabeira-serrana.
3. Embrionogênese somática. 4. Fluridone. 5. Imersão temporária.
I. Guerra, Miguel Pedro. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos
Vegetais. III. Título.

CDU 631

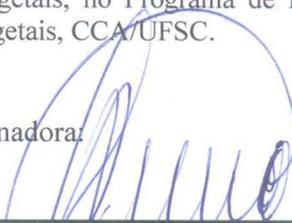
Embriogênese somática em *Acca sellowiana*: avanços na indução e conversão

por

Clarissa Alves Caprestano

Dissertação julgada e aprovada em 14/12/2010, em sua forma final, pelo Orientador e Membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.

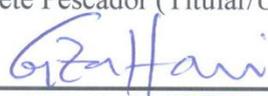
Banca Examinadora:



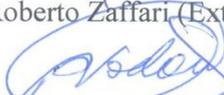
Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra (Presidente /Orientador)



Prof.ª Dr.ª Rosete Pescador (Titular/UFSC)



Prof. Dr. Gilmar Roberto Zaffari (Externo/EPAGRI)



Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari (Coordenador do Programa)

Florianópolis, dezembro de 2010

*A minha GRANDE família,
sempre presente em todos os momentos.
Ofereço.*

*Aos meu PAIS, Valmor e Cida,
por todo amor e carinho.
Dedico*

Agradecimentos

Meus pais, Valmor e Cida, e as minhas irmãs, Renata e Paula, muito obrigada pelo incentivo e pela paciência. Muito obrigada pelo exemplo de cada dia e por me ensinar que a família é o bem mais importante que podemos ter.

A mais querida e linda das avós, Vó Maria, exemplo de superação.

Ao Adriano, Vitor e Vicente, a família da minha irmã que eu considero minha também.

Ao professor Miguel Guerra, pela confiança e ensinamentos, muito obrigada por esses anos de supervisão.

Ao professor Rubens Nodari, pelos ensinamentos e confiança.

Ao professor (~~bisavô~~) Airton Uberti, exemplo de profissional e de ser humano.

À professora Eny Floh pela oportunidade realizar as análises bioquímicas. E obrigada também à Amanda, por todo auxílio nas análises bioquímicas.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, por todos os ensinamentos. À Berna por toda a dedicação ao programa.

À Aline Mabel Rosa por toda ajuda na elaboração dos experimentos, menina você vai longe... mesmo se bandeando pra genética...

À Sarah Agapito por toda amizade, confidências e auxílio nas dúvidas moleculares... amigos assim são raros de encontrar...

Ao Douglas Steinmacher, pelos ensinamentos via MSN, todas as discussões filosóficas e pelas excelentes revisões.

Ao Lírio Dal Vesco por todos os ensinamentos e por não me importunar durante a TPM.

Ao pessoal do mestrado, por todas as risadas em sala de aula e auxílios. Em especial ao André Sezerino e Olavo Gavioli pelos domingos de estudo e/ou risadas...

À Daniela Schmitz, Marian Woeltje e Guilherme Gomes por toda amizade, muito obrigada por expandirem meu horizonte.

À Leila Vieira e Sara Ferrigo por me tirarem do lab nas melhores horas.

Aos meus companheiros de apartamento Fábio e Priscila, obrigada por tudo.

À Karine e Alexandre Siminski por me cederem a casa, muito obrigada pela confiança.

Ao povo do laboratório: Alan, Alisson Camila, Cleomar, Cristina Santa Ana, Cristina Santos, Denise, Diogo, Flor, Francine, Gustavo, Henrique, Hugo, Jeny, Josiane, Leon, Lin, Maria Carolina, Maria Luisa, Neusa, Pâmela, Paula, Paulo, Peggy, Preto, Rafael, Régis, Vinícius, Vitor e Yohan pelos momentos de descontração e pelo apoio. Ao Daniel, muito obrigada pelo auxílio nas polinizações; Ana, obrigada pelas pilhas de tubos lavados e Ramon, pelos melhores cafés do lab.

A Universidade Federal de Santa Catarina pelo ensino público gratuito e de qualidade.

Ao CNPq e FAPESC pelo apoio financeiro.

“... e aqueles que dançavam eram considerados loucos por
aqueles que não podiam ouvir a música.”
Nietzsche

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – a) Plantas representantes do banco ativo de germoplasma de *Acca sellowiana* na Estação Experimental da Epagri de São Joaquim; b) Frutos, e; c) Flores de *Acca sellowiana*. 26
- Figura 2 - Modelo hipotético dos eventos subjacentes à embriogênese somática. Adaptado de Fehér (2006). 31
- Figura 3 - Processo de dois ciclos para a indução e modulação da embriogênese somática. A) Estabelece condições básicas para a obtenção de ciclos repetitivos de divisão celular e B) Estabelece condições básicas para a progressão e maturação dos embriões somáticos e posterior e regeneração de plantas. Adaptado de Durzan (1988) e Guerra *et al.* (1999) e Cangahuala-Inocente, 2007. 32
- Figura 4 - Anormalidades em embriões auxina-mutantes de *Arabidopsis* (MOOLER e WEIJERS, 2009). 34
- Figura 5) Via biossintética dos carotenóides e ABA. O efeito inibitório do fluridone pela phytoene desaturase (PDS) em destaque (Barreiro *et al.*, 2007). 36
- Figura 6) a) Embriões somáticos de *A. sellowiana* em diferentes estágios de desenvolvimento (globular, coração, torpedo e cotiledonar); b) Embriões somáticos induzidos pelo pré-tratamento com 2,4-D (200 µM) durante 60 minutos, após 90 dias em cultura; c) Embriões somáticos induzidos em meio de cultura suplementado com 2,4-D (20µM) após 90 dias em cultura; d) Embriões zigóticos germinados em meio de cultura isento de 2,4-D. 57
- Figura 7) Número de embriões somáticos de *Acca sellowiana*, aos 90 dias de cultivo, obtidos em resposta à indução convencional, pela suplementação de 2,4-D ao meio de cultivo (20µM) e em resposta ao pré-tratamento com 2,4-D (200µM por 60 minutos) após 90 dias em cultura e. Letras diferentes diferem segundo o t-teste (5%). CV: 5,24%. 59
- Figura 8) Distribuição, em percentual, dos estádios de desenvolvimento (globular, coração, torpedo, cotiledonar e com aparência anormal) dos embriões somáticos de *Acca sellowiana*, aos 90 dias de cultivo, obtidos em resposta ao pré-tratamento com 2,4-D

(200µM, 60 min.) e à suplementação de 2,4-D no meio de cultivo (20µM). Letras diferentes, nas categorias, diferem segundo o t-teste (5%). CV: Globular 7,06%; Coração 6,16%; Torpedo 1,78%; Cotiledonar 2,2%; Anormal 10,4%..... 60

Figura 9) Distribuição dos embriões somáticos de *Acca sellowiana* convertidos em plântulas (plântulas normais, plântulas anormais, embriões não convertidos brancos e embriões não convertidos oxidados), aos 30 dias de cultivo, obtidos em resposta ao pré-tratamento com 2,4-D (200 µM, 60 min.) e à indução convencional com a suplementação de 2,4-D ao meio de cultura (20µM). Letras diferentes nas categorias diferem segundo o t-teste (5%). CV: Verdes 11,97%; Verdes anormais 8,54%; Brancos 16,25%; 13,39%..... 61

Figura 10) Embriões somáticos anormais e plântulas de *Acca sellowiana*: a) Plântula com somente um cotilédone; b) Plântulas com cotilédones fusionados; c) Presença de três cotilédones; d) Plântulas derivadas de embriões normais. 62

Figura 11) Teores endógenos de ABA (µg/g de MF) em culturas controle, induzidas convencionalmente com 20 µM de 2,4-D e induzidas por pré-tratamento com 200 µM, 60 min de 2,4-D de *Acca sellowiana*, aos noventa dias de cultivo (Média ±desvio padrão). 63

Figura 12) Teores endógenos de AIA (µg/g de MF) em culturas controle, induzidas convencionalmente e aquelas induzidas através do pré-tratamento com 2,4-D de *Acca sellowiana*, aos noventa dias de cultivo. (Média ±desvio padrão). 64

Figura 13) Poliaminas endógenas livres (µg/g de MF) nas culturas de *Acca sellowiana* derivadas do tratamento controle não embriogênicas, induzidas convencionalmente e aquelas induzidas através do pré-tratamento com 2,4-D, aos noventa dias de cultivo. Dados apresentados em Média ± desvio padrão. Letras diferentes na série diferem segundo o teste SNK (5%)..... 69

Figura 14. Razão Put.(Spm+Spd)⁻¹ em culturas não embriogênicas, induzidas convencionalmente e aquelas induzidas através do pré-tratamento com 2,4-D de *Acca sellowiana*, aos noventa dias de cultivo (Média ± desvio padrão). 70

Figura 15) Distribuição dos fenótipos observados na conversão de embriões somáticos de *Acca sellowiana* aos trinta dias de cultivo, submetidos a diferentes concentrações de Fluridone (0,1; 10 ou 20 μM). Letras diferentes na série diferem segundo o teste SNK 5%. CV= Normal clorofilado 110,4%; Anormal clorofilado 110,1%; Aclorofilado 3,6%; Antocianinas 20,2%. Dados transformados em Raiz(x+0,5). 86

Figura 16) Plântulas de *Acca sellowiana* convertidas em bioreator de imersão temporária RITA®: a) plântulas convertidas em meio suplementado com; b) plântulas obtidas em resposta ao fluridone 0,1 μM c) plântulas convertidas em meio suplementado com fluridone 20 μM ; d) aspecto das plântulas obtidas em resposta ao fluridone 0,1 μM 87

Figura 17) Plântulas de *Acca sellowiana* convertidas em bioreator de imersão temporária RITA®: a) Plântulas convertidas em meio suplementado com fluridone 0,1 μM ; b) Plântulas convertidas em meio suplementado com fluridone 5 μM . Notar a ausência de clorofila nas plântulas. 87

Figura 18) Distribuição dos fenótipos observados na conversão de embriões somáticos de *Acca sellowiana* aos trinta dias de cultivo, submetidos a diferentes concentrações de Fluridone (0,1; 1,0; 5,0 ou 10 μM). Letras diferentes na série diferem segundo o teste SNK 5%. * Dados transformados em Raiz(x+0,5) **Dados transformados em Log(x + 1). CV= Normal clorofilado 115,1; Anormal clorofilado 117,4; Carotenóides 17,4%; Branco 12,3%..... 88

Figura 19) Distribuição dos fenótipos observados na conversão de embriões somáticos de *Acca sellowiana* aos trinta dias de cultivo, submetidos a diferentes concentrações de Fluridone (0; 0,025; 0,05 ou 0,2 μM). Dados transformados em Raiz(x+0,5). CV= Normal clorofilado 28,5%; Anormal clorofilado 36,8%; Antocianinas 22,1%. Letras diferentes na série diferem segundo o teste SNK 5%..... 89

Figura 20) Conversão de embriões somáticos de *Acca sellowiana* em bioreator de imersão temporária RITA®: a) Embriões convertidos em meio suplementado com fluridone 0,025 μM ; b) Embriões convertidos em meio suplementado com fluridone 0,2 μM ; c) Plântula normal; d) plântula anormal com cotilédones fusionados, onde houve a formação de clorofila; e) Plântula normal onde não houve a formação de

clorofila, somente de antocianinas; f) Plântula anormal com um único cotilédone onde não houve a formação de clorofila, somente de antocianina. 91

Figura 21) Plântulas de *Acca sellowiana* obtidas a partir de embriões anormais aos 15 dias de subcultivo: a) Plântula obtida de embrião tri cotiledonar, seta amarela indica os cotilédones, vermelha oprime iro trio de folhas e brancas o terceiro par de folhas; b) Plântula obtida de embrião tri cotiledonar, seta vermelha indica os cotilédones e brancas o primeiro par de folhas; c) Plântulas obtidas de embriões fusionados a seta indica o desenvolvimento de plântulas normais; d) Plântula obtida de embriões co cotilédones bipartidos, setas vermelhas indicam folhas alternas e setas amarelas o seguinte par de folhas opostas..... 92

Figura 22) Protocolo proposto para a embriogênese somática de *Acca sellowiana*. 99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teores de aminoácidos livres ($\mu\text{g/g}$ de matéria fresca) em culturas de *A. sellowiana* isentas de 2,4-D (controle); induzidas com 2,4-D (20 μM) (indução convencional) e induzidas por pré-tratamento com 200 μM de 2,4-D por 60 min, aos noventa dias de cultivo. Letras diferentes na linha diferem segundo o teste SNK 5% 66

Tabela 2. Comparação das porcentagens de aminoácidos livres em culturas controle não embriogênicas, induzidas convencionalmente e aquelas induzidas através do pré-tratamento com 2,4-D de *Acca sellowiana*, aos noventa dias de cultivo. 67

LISTA DE ABREVIATURAS

% - porcentagem

µg – Micrograma

µM –Micro molar

µm - Micrômetros

µL - Micro litro

2,4-D – Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

2-iP - 2-Isopentiladenina (6-dimetilaminopurina)

aa – Aminoácido

ABA – Ácido abcísico

ABI3 - Arabidopsis ABA-insensitive 3

AG₃ – Ácido giberélico

AIA – Ácido indol-acético

ANA – Acido α- naftalenoacético

ANOVA- Análise da variância

ATM – Atmosfera

BAP – 6-benzilaminopurina

CCA – Centro de Ciências Agrárias

Cdv – Cadaverina

cv- Coeficiente de Variação

DAH – Diaminoheptano

EPAGRI – Empresa Catarinense de Pesquisa e Extensão Rural

ES – Embrião somático

EZ – Embrião zigótico

Fluridone - metil-3-fenil-5-[3-(trifluormetil)-fenil]-4(1H)-piridinona

g – Gramas

GABA - Acido γ-aminobutírico

Glu – Ácido Glutâmico

h – hora

HAc – Ácido acético glacial

HCl – Ácido clorídrico

HPLC- Cromatografia líquida de alta performance

LEA - late embryogenesis abundant

LFDFV – Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e de Genética Vegetal

LPm – von Arnold e Eriksson, 1981

MeOH – Metanol

mg – Miligrama

min – Minuto
ml - Mililitro
mm – Milimetro
mM – Milimolar
nm - Nanomêtro
°C – Graus Celsius
PAs - Poliaminas
PCA – Ácido perclórico
PDS - phytoene desaturase
Put – putrescina
PVP – polivinil propileno
RPM – Rotações por minuto
SNK – Neuman- Keus
Spd – Spermidina
Spm – Spermina
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

Sumário

LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE ABREVIATURAS	17
INTRODUÇÃO	21
OBJETIVO GERAL	22

CAPÍTULO 1 – ESTADO DA ARTE E SITUAÇÃO DO PROBLEMA.....

1. <i>Acca sellowiana</i>	25
2. Embriogênese somática	28
3. Embriogênese somática em <i>Acca sellowiana</i>	29
4. Controle hormonal: AIA e ABA	33
5. Relação Fluridone/ABA	35
6. Poliaminas	35
7. Referências bibliográficas	39

CAPÍTULO 2 – A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Acca sellowiana* É AFETADA PELO 2,4-D, COM EFEITOS NA INDUÇÃO, CONVERSÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS E NOS TEORES DE ABA, AIA, POLIAMINAS E AMINOÁCIDOS

1. Resumo	49
2. Abstract	50
3. Introdução	51
4. Material e métodos	53
4.1 Indução	53
4.2 Extração e quantificação de AIA-ABA	54
4.3 Extração e quantificação de poliaminas	55
4.4 Extração e quantificação de aminoácidos	56
5. Resultados e discussão	57
5.1 Indução da embriogênese somática	57
5.2 Conversão dos embriões somáticos em plântulas	60
5.3 Níveis endógenos de ABA e AIA	62
5.4 Aminoácidos	64
5.5 Poliaminas endógenas	68
6. Referências bibliográficas	71

***CAPÍTULO 3 – O EFEITO DO FLURIDONE NA
CONVERSÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Acca
sellowiana* CULTIVADOS EM BIORREATOR DE
IMERSÃO TEMPORÁRIA RITA® 77***

1. Resumo	79
2. Abstract.....	80
3. Introdução	81
4. Material e métodos	83
4.1 Material vegetal	83
4.2 Efeito do Fluridone.....	83
5. Resultados e discussão	85
5.1 Efeito do fluridone na conversão dos embriões somáticos	85
6. Referências bibliográficas	93

Conclusões e perspectivas futuras 97

INTRODUÇÃO

A *Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret é uma espécie pertencente à família Myrtaceae, conhecida popularmente como goiabeira serrana. Uma série de trabalhos multidisciplinares envolvendo a domesticação da goiabeira serrana, com ênfase na área de melhoramento genético e da aplicação das técnicas de cultura vegetal para a micropropagação desta espécie têm sido realizados por diferentes grupos de pesquisa. Estudos morfofisiológicos com o auxílio das técnicas de cultura vegetais, notadamente a embriogênese somática, permitem a propagação massal clonal de genótipos superiores, além de servir como modelo de estudos fisiológicos, genéticos e bioquímicos do desenvolvimento embrionário.

A embriogênese somática é uma dos principais sistemas de regeneração de plântulas *in vitro*, pois permite a redução de custos associados a um maior rendimento biológico em comparação aos demais sistemas de micropropagação. A técnica da embriogênese somática em *Acca sellowiana* tem sido estudada desde 1997 no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal do CCA/UFSC e vários pontos de controle do protocolo foram otimizados, sendo possível alcançar um rendimento de mais de mil embriões somáticos por explante. Entretanto, a técnica ainda precisa ser aprimorada, podendo ser associada a outras técnicas como a imersão temporária para a conversão dos embriões somáticos. Desta forma, o presente estudo busca elucidar pontos de controle durante a indução e conversão de embriões somáticos de *Acca sellowiana*.

Este trabalho foi redigido em forma de capítulos visando a melhor compreensão dos dados. O primeiro capítulo está relacionado a uma revisão bibliográfica sobre os aspectos da embriogênese somática com ênfase em *Acca sellowiana*. O segundo capítulo aborda a influência do 2,4-D na embriogênese somática desta espécie e como este fitorregulador afeta a conversão dos embriões somáticos. Aspectos bioquímicos relacionados com os teores de ABA, AIA, poliaminas e aminoácidos também foram analisados para uma maior elucidação do processo. O terceiro capítulo aborda a conversão dos embriões somáticos em plântulas em resposta ao uso de biorreatores de imersão temporária e do Fluridone, um inibidor da síntese de ABA.

OBJETIVO GERAL

O presente trabalho visou elucidar os fenômenos morfofisiológicos e bioquímicos resultantes da indução da embriogênese somática com 2,4-D e avaliar a conversão dos embriões somáticos de *Acca sellowiana* em resposta ao uso de biorreatores de imersão temporária associado ao uso de fluridone.

CAPÍTULO 1 – ESTADO DA ARTE E SITUAÇÃO DO PROBLEMA

1. *Acca sellowiana*

A família *Myrtaceae*, com uma distribuição Pantropical e compreendendo 5.674 espécies, é a nona maior família de angiospermas (GOVAERTS *et al.*, 2008), sendo a família de plantas lenhosas dominante na Mata atlântica (BARROSO e PERON, 1994). As plantas desta família possuem importância econômica direcionada a produção de madeira, goma, óleos essenciais, frutos e ornamental (GOVAERTS *et al.*, 2008).

Myrtaceae é considerada uma família monofilética e bem delimitada, mas com considerável discordância entre os autores quanto à circunscrição de gêneros e espécies, o que tem impulsionado estudos filogenéticos recentes (WILSON *et al.* 2005; LUCAS *et al.*, 2005; LUCAS *et al.*, 2007). Wilson e colaboradores (2005) subdiviram a família das *Myrtaceae* em duas subfamílias: *Psiloxylloideae* e *Myrtoideae*. A subfamília *Psiloxylloideae* apresenta apenas duas tribos, sendo caracterizada por plantas díóicas e número de cromossomos igual a 12 (WILSON *et al.*, 2005). A subfamília *Myrtoideae*, caracterizada por plantas monóclinas e com número cromossômico base 11, é a maior subfamília, compreendendo 15 tribos (WILSON *et al.*, 2005; LUCAS *et al.*, 2007). Dentre estas tribos, a tribo *Myrteae* se distingue das outras 14 tribos de *Myrtoideae* por possuir frutos carnosos indeiscentes, sistema vascular transeptal e, comumente a presença de tricomas uni ou pluricelulares. A maior diversidade de espécies de *Myrteae* ocorre na América do Sul, particularmente ao longo da costa leste brasileira e nas terras altas da Guiana e do Caribe (LUCAS *et al.*, 2007). Esta tribo compreende 49 gêneros e cerca de 2.500 espécies (GOVAERTS *et al.*, 2008), com uma distribuição Pantropical. Dentro desta tribo destacam-se diversas frutíferas como as dos gêneros *Eugenia*, *Campomanesia*, *Psidium* e *Acca*.

A *Acca sellowiana* é uma frutífera arbustiva nativa do Brasil, conhecida popularmente como goiabeira-serrana, quirina, pineapple-guava ou simplesmente feijoa (MATTOS, 1986) (Figura 1a). O seu fruto é uma baga (Figura 1 – a) Plantas representantes do banco ativo de germoplasma de *Acca sellowiana* na Estação Experimental da Epagri de São Joaquim; b) Frutos, e; c) Flores de *Acca sellowiana*. b) semelhante ao da goiabeira comum (*Psidium guajava*) com sabor doce-acidulado e excelente aroma (DUCROQUET e RIBEIRO, 1991). A qualidade do aroma deste fruto está relacionada à produção de etilbutirato, metil e etilbenzoato, além de aldeídos aromáticos (SEIDEMANN, 1994). Este

mesmo autor analisou a composição dos frutos de *A. sellowiana*, destacando-se os seguintes compostos: água 79,2%; açúcares totais 6,04%; cinzas 0,53%; pectinas solúveis em água 0,74%, pectinas solúveis em ácido 1,05%, e dentro das vitaminas a C com 0,33 mg.g de fruto⁻¹.

No final do século XIX esta espécie foi levada para a França de onde foi difundida pelo mundo. Em 1900 a goiabeira-serrana espalhou-se para todas as regiões caucasianas que margeiam o Mar Cáspio e Negro, em especial o Azerbaijão e Geórgia, acontecendo assim a primeira expansão comercial significativa desta fruteira (DUCROQUET *et al.*, 2000).

Atualmente esta espécie é cultivada comercialmente na Nova Zelândia, Califórnia, Repúblicas da Geórgia e Azerbaijão, Colômbia e Israel (HEWETT, 1993; DUCROQUET *et al.*, 2000). No Brasil existem apenas alguns pomares nos Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul e também em São Paulo e Minas Gerais, na Serra da Mantiqueira (DUCROQUET *et al.*, 2000). Estudos de mercado mostraram que a goiaba serrana tem uma boa aceitação por parte do consumidor desde que ele venha a ter a oportunidade de degustar o fruto. Comparando com o mercado de outras frutas, pode-se dizer que em preços iguais, a goiaba serrana poderá ocupar um mercado similar ao do quivi, da ameixa, da pêra ou ainda ao da goiaba comum de mesa (DUCROQUET *et al.*, 2002).



Figura 1 – a) Plantas representantes do banco ativo de germoplasma de *Acca sellowiana* na Estação Experimental da Epagri de São Joaquim; b) Frutos, e; c) Flores de *Acca sellowiana*.

No planalto catarinense, centro de diversidade desta espécie, seu plantio comercial apresenta-se como uma alternativa para suprir o mercado interno e externo, pois neste local esta espécie não apresenta problemas de adaptação (DAL VESCO, 1999). Assim, a partir por iniciativa do pesquisador Dr. Jean-Pierre H. J. Ducroquet, pesquisador da EPAGRI/São Joaquim, foi estabelecido um Banco Ativo de Germoplasma (BAG), inicialmente na Estação Experimental de Videira, sendo o mesmo transferido posteriormente para a Estação Experimental de São Joaquim. Este BAG foi criado com o intuito de coletar e preservar a diversidade genética de *A.sellowiana* tornando-a acessível para trabalhos de melhoramento e seleção de clones aptos ao cultivo, pela suas características de produtividade, resistência e qualidade dos frutos (STEFANELLO, 2000). Trabalhos de caracterização da diversidade genética deste banco ativo de germoplasma em São Joaquim revelaram a existência de uma alta variabilidade genética entre os acessos, o que indica um alto potencial para o melhoramento genético desta planta (NODARI *et al.*, 1997).

Um convênio entre a EPAGRI e o Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina foi estabelecido na década de 1990, visando ampliar, de forma articulada, integrada e multidisciplinar, o desenvolvimento de trabalhos de pesquisa na forma de um programa integrado de domesticação da goiabeira serrana. Este programa culminou no lançamento das quatro primeiras cultivares de goiabeira serrana para o estado de Santa Catarina: Helena, Alcântara, Nonante e Mattos (DUCROQUET *et al.* 2007; 2008)

A *Acca sellowiana* apresenta fecundação cruzada, favorecida pela biologia floral (PUGLIANO, 1980 e SOH, 1985) (Figura 1c) e assegurada por várias espécies de pássaros que se alimentam de suas pétalas (DUCROQUET e HICKEL, 1997). Dessa forma, a propagação sexuada não permite a fixação das características desejadas das plantas matrizes ou germoplasma elite. Por outro lado, os processos convencionais de propagação vegetativa como estaquia por plantas semi-lenhosas, mergulhia de cepa e os métodos de propagação por enxertia resultaram em baixa eficiência (FACHINELLO *et al.*, 1992; DUARTE *et al.*, 1992).

Por estas limitações, a propagação *in vitro* oferece um conjunto de técnicas que possibilitam a propagação massal de genótipos selecionados, permitindo a captura e fixação de ganhos genéticos (GUERRA *et al.*, 1999). A aplicação desta técnica é dependente da

indução e controle da morfogênese *in vitro* em suas duas rotas: organogênese e embriogênese somática. A micropropagação por organogênese desta espécie apresenta limitações na taxa de multiplicação (DAL VESCO, 1999; OLTAMARI *et al.*, 2000). Por outro lado a embriogênese somática é a técnica que possibilita uma maior taxa de multiplicação, assumindo uma grande importância para a propagação massal da espécie.

2.Embriogênese somática

A embriogênese somática é o processo através do qual células somáticas isoladas, ou pequenos grupos destas, sofrem uma série de alterações morfológicas e bioquímicas que resultam na formação de embriões somáticos, sendo um processo biológico análogo a embriogênese zigótica e considerado a máxima expressão da totipotencialidade das células vegetais (AMMIRATO, 1983; GUERRA *et al.*, 1999; QUIROZ-FIGUEROA *et al.*, 2006). Esta rota morfogenética *in vitro* possui aplicações importantes para a multiplicação massal de genótipos superiores e também na obtenção de sistemas biológicos referenciais para estudos de fisiologia, bioquímica, moleculares e morfogenéticos do desenvolvimento embrionário vegetal (GUERRA *et al.*, 1999; QUIROZ-FIGUEROA *et al.*, 2006).

A aquisição da competência embriogenética é dependente de vários fatores intrínsecos ao explante, como o genótipo de origem do explante e sua condição fisiológica, e outros ligados as condições de cultivo, como a composição do meio de cultivo, concentração do regulador de crescimento e as transferências sequenciais (GUERRA *et al.*, 1999; STEINMACHER, 2005; FEHÉR, 2006; STEINMACHER *et al.*, 2007). A aquisição da competência embriogenética é considerada o fator mais crítico no processo de embriogênese somática, altamente dependente da divisão e desdiferenciação celular (FEHÉR *et al.*, 2003; STEINMACHER, 2005; STEINMACHER *et al.*, 2007).

Fehér (2006) propôs um modelo hipotético dos eventos subjacentes à embriogênese somática (Figura 2). Uma série de sinais paralelos, incluindo a concentração de auxina (suplementação exógena ou a alteração dos níveis endógenos), estresses e o próprio cultivo *in vitro*, induzem uma ampla resposta celular, incluindo reorganizações em níveis de estrutura celular e expressão gênica. Como resultado, as células se tornam desdiferenciadas e competentes para a embriogênese. As células competentes expressam a capacidade embriogênica se as condições de cultivo forem permissivas a expressão do programa

embriogênico que é, na maioria dos casos, precedido pela divisão das células precursoras de acordo com um plano pré-determinado. Outras divisões celulares, juntamente com o estabelecimento da polaridade e o padrão de formação, irão resultar no desenvolvimento do embrião.

A modulação da embriogênese somática em angiospermas ocorre em um sistema de dois ciclos. O primeiro ciclo tem seu início na indução em meio de cultivo contendo auxinas e/ou citocininas, seguido da possível multiplicação em meios contendo auxinas em baixas concentrações. A fase de multiplicação pode ser efetuada em meio líquido em biorreatores e enquanto as demais fases são geralmente realizadas em meio de cultura semi-sólido (DURZAN, 1988; GUERRA *et al.*, 1999). A maturação dos embriões somáticos caracteriza a saída do ciclo de multiplicação e entrada no ciclo de maturação. Embriões somáticos são normalmente passíveis de germinação em meios de cultura isentos de fitorreguladores de crescimento ou em baixas concentrações de citocininas e ácido giberélico (Figura 3).

3. Embriogênese somática em *Acca sellowiana*

A embriogênese somática em *Acca sellowiana* foi descrita por Cruz *et al.* (1990) a partir de calos originados na região cotiledonar de embriões zigóticos. Posteriormente, Dal Vesco (1999) descreveu a formação de estruturas pró-embriogênicas a partir de embriões zigóticos inoculados em meio LPm, sendo a presença essencial de ácido 2,4-dicloroacético (2,4-D) (20 μM) e 2-iP (1 μM). Concentrações de 3 a 5 μM de 2,4-D induziram a formação de culturas não embriogênicas, enquanto que níveis de 1 μM de 2,4-D ou meios isentos deste fitorregulador induziram a formação e desenvolvimento dos embriões somáticos.

A partir de filamentos da antera, Stefanello *et al.* (2000) obtiveram a indução de culturas embriogênicas, sendo a maior taxa de indução de calos obtida em meio LP geleificado, suplementado com Picloram (Pi)(1 e 10 μM) e Cinetina (Kin) (0,5 μM). Estas culturas foram posteriormente transferidas para meio líquido LP, suplementado com 2,4-D (1 μM) e 2-iP (1 μM). Entretanto, este protocolo não apresentou reprodutibilidade (CANGAHUALA-INOCENTE *et al.*, 2007a), o que foi atribuído às características genótipo-dependentes da espécie (CAPRESTANO *et al.*, 2004; GUERRA *et al.*, 2001).

Dal Vesco e Guerra (2001) testando diversas fontes de nitrogênio e concentrações destas verificaram que os níveis e balanços destas afetaram significativamente a indução e o desenvolvimento dos

embriões somáticos de *Acca sellowiana*. Posteriormente, o protocolo foi aprimorado por Cangahuala-Inocente *et al.* (2007b), utilizando a combinação de 2,4-D (20 μ M) e ácido glutâmico (Glu) (8mM) em meio de cultura LPM. A conversão dos embriões somáticos em plântulas ocorreu em meio de cultura LPM suplementado com BAP, AG₃ e carvão ativado, porém uma baixa taxa de conversão foi observada.

Estudos morfo-histológicos também já foram conduzidos e identificaram o processo de diferenciação de embriões somáticos a partir de células do cotilédone do embrião zigótico de *Acca sellowiana* (CANHOTO *et al.*, 1996; CANGAHUALA-INOCENTE *et al.* 2004). A diferenciação de embriões somáticos neste estudo ocorreu em duas etapas: (i) formação de centros meristemáticos a partir do processo de segregação celular, (ii) formação de uma camada de células periférica que circunda o centro meristemático, onde cada célula da camada periférica demonstra competência embriogênica. A primeira divisão celular desta camada de células é periclinal e as subsequentes divisões ocorrerem em vários planos até a formação de embriões somáticos completos. Estes autores concluíram também que as células competentes são pequenas, isodiamétricas e as células imediatamente abaixo das embriogênicas possuem vacúolos preenchidos por compostos fenólicos (CANGAHUALA-INOCENTE *et al.* 2004; REIS *et al.*, 2009).

Estudos da dinâmica de açúcares solúveis e de proteínas totais durante a indução da embriogênese somática de *A. sellowiana*, demonstraram, respectivamente, um acréscimo e decréscimo destes compostos durante os 30 primeiros dias em cultura. Sendo que estes níveis permaneceram constantes até os 120 dias. Entretanto, quando avaliados os embriões somáticos, os teores das proteínas totais apresentaram um incremento de acordo com a progressão dos embriões somáticos. Teores de açúcares totais e de amido tiveram um incremento nos estádios cordiforme e cotiledonar e um decréscimo nos estádios torpedo e pré-cotiledonar. Assim, a dinâmica destes compostos parece exercer um papel chave no desenvolvimento de embriões somáticos desta espécie (CANGAHUALA-INOCENTE *et al.*, 2009a).

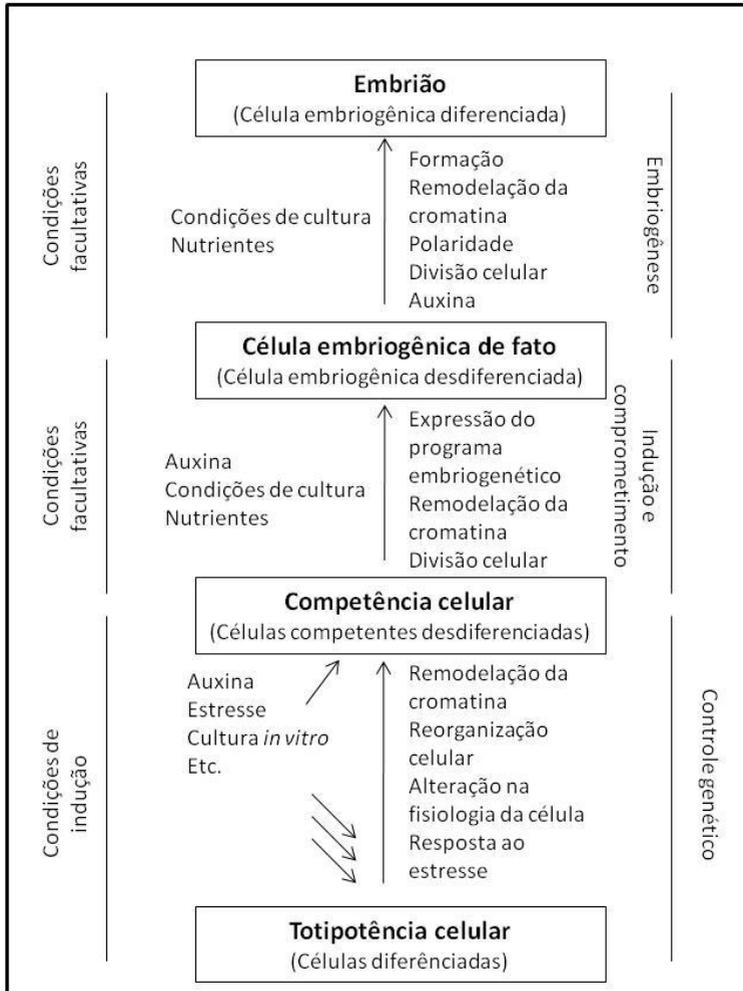


Figura 2 - Modelo hipotético dos eventos subjacentes à embriogênese somática. Adaptado de Fehér (2006).

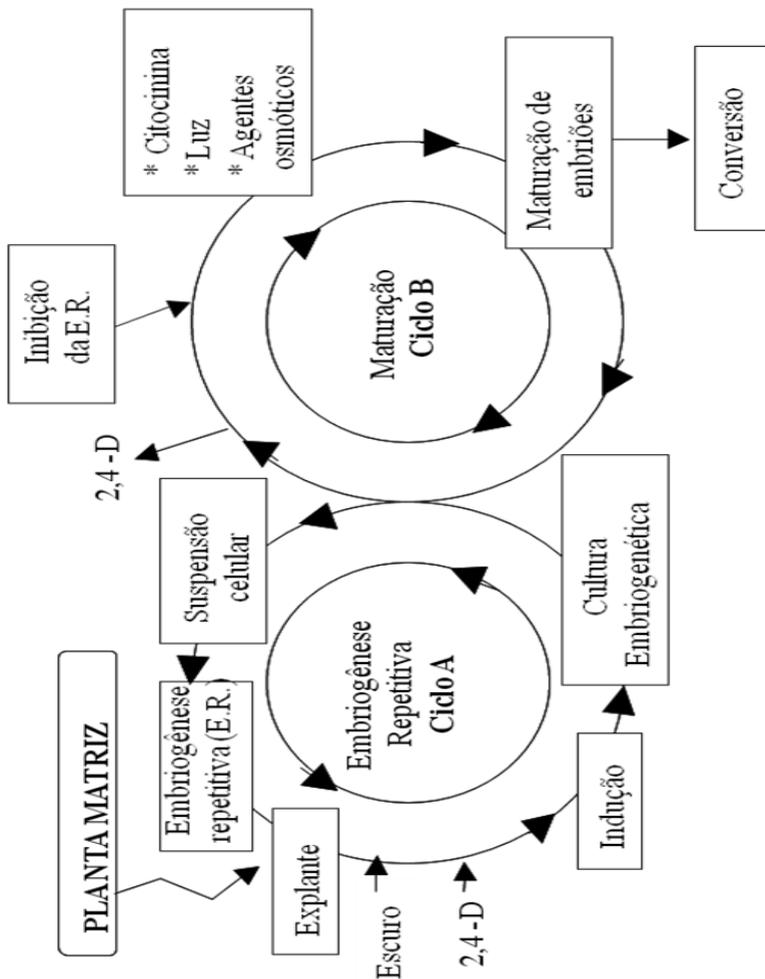


Figura 3 - Processo de dois ciclos para a indução e modulação da embriogênese somática. A) Estabelece condições básicas para a obtenção de ciclos repetitivos de divisão celular e B) Estabelece condições básicas para a progressão e maturação dos embriões somáticos e posterior e regeneração de plantas. Adaptado de Durzan (1988) e Guerra *et al.* (1999) e Cangahuala-Inocente, 2007.

4. Controle hormonal: AIA e ABA

Vários estudos vêm investigando os papéis dos hormônios ácido 3-indol acético (AIA) e ácido abscísico (ABA) e seus níveis durante as fases iniciais da embriogênese (FEHÉR *et al.*, 2003). O AIA é a auxina mais abundante e de maior relevância fisiológica nos vegetais superiores (MURPHY, 2008) envolvido nos processos de crescimento e divisão celular, diferenciação do sistema radicular e na polaridade do embrião (LUI *et al.*, 1993; KONG *et al.*, 1997). Fry e Wangermann (1976) foram os primeiros a propor que a iniciação do transporte polar de auxina no embrião globular pode mediar a polaridade morfológica expressa nos posteriores estádios da embriogênese. Liu *et al.* (1993) trabalhando com mutantes *pin1-1* de *Arabidopsis* concluíram que a interferência no transporte polar de auxina causa uma falha na transição da simetria axial para a bilateral, resultando em embriões com cotilédones fusionados. A indução da expressão gênica mediada por auxinas envolve a degradação de repressores transcripcionais de AUX/AIA e AIA12, sendo que requerem para isso um co-repressor TIR1 durante o desenvolvimento embrionário radicular (GRAY *et al.*, 2001).

Em uma revisão sobre o controle da auxina na padronização do embrião, Mooler e Weijers (2009) identificaram fenótipos distintos que um embrião mutante para biossíntese de auxina pode apresentar (Figura 4). Estes defeitos embrionários estão relacionados em três diferentes fases do desenvolvimento embrionário: a) divisão transversal ao invés da divisão longitudinal da célula apical na fase unicelular; b) Na fase globular, dois fenótipos podem ser distinguidos: no primeiro a célula da hipófise é dividida anormalmente, resultando em plantas sem raízes, e num segundo podem ocorrer divisões vasculares anormais; c) no estágio coração a formação e/ou separação dos cotilédones são prejudicados resultando na fusão dos cotilédones, número de cotilédones anormais, ou ausência total de cotilédones. Além destes mutantes, outros são relacionados, tais como os que apresentam defeitos nos cotilédones e no meristema radicular. Os defeitos em mutantes de meristema radicular são o resultado da divisão aberrante da célula do suspensor, exceto para os mutantes *plt1*, *plt2*, *plt3* e *plt4* para os quais os descendentes tiveram uma divisão anormal da célula da hipófise. Assim, sabendo-se da dinâmica do AIA é possível estabelecer relações entre a formação de embriões somáticos anormais e o conteúdo endógeno de AIA.

Outro hormônio envolvido nos mecanismos de controle do desenvolvimento vegetal é o ácido abscísico (ABA). O ABA desempenha um papel central em respostas a estresse bióticos e abióticos e também

em muitos processos de desenvolvimento vegetal (JIANG e YU, 2009). Ele regula aspectos importantes do crescimento e desenvolvimento de plantas, tais como o desenvolvimento embrionário, promoção da tolerância a dessecação e dormência em sementes, germinação e estabelecimento das plântulas e o desenvolvimento vegetativo (CUTLER *et al.*, 2010).

O ABA possui uma dupla função durante o crescimento e o desenvolvimento da semente. No início da embriogênese o ABA previne o abortamento das sementes e promove o crescimento do embrião. Em contraste, durante os estágios mais tardios da embriogênese ocorre um incremento nos níveis de ABA, bloqueando o crescimento do embrião e inibindo a ação do ácido giberélico (GA) que promove a germinação (NAMBARA e MARION-POLL, 2005).

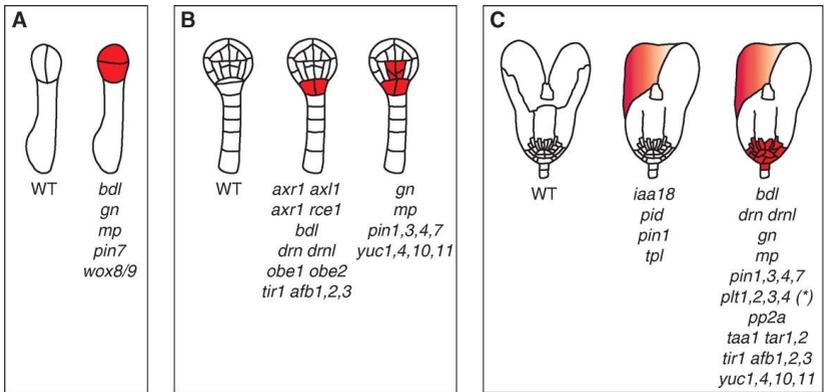


Figura 4 - Anormalidades em embriões auxina-mutantes de *Arabidopsis* (MOOLER e WEIJERS, 2009).

Ao contrário de embriões zigóticos, os embriões somáticos não se tornam dormentes. O desenvolvimento dos embriões somáticos não é interrompido e eles podem germinar imediatamente (IKEDA-IWAI *et al.*, 2006). Esta afirmação está baseada em estudos que demonstraram que apesar de os embriões somáticos de *Arabidopsis* apresentarem a expressão dos genes *ABI3* (*Arabidopsis* ABA-insensitive 3) e o homólogo *DcABI3* em cenoura, os níveis de expressão dos genes *LEA* (late embryogenesis abundant) foi muito baixo (SHIOTA *et al.*, 1998; IKEDA-IWAI *et al.*, 2002, 2003). Este aspecto pode ser atribuído aos baixos níveis de ABA endógeno nos embriões somáticos (KAMADA e

HARADA, 1981) dado que a aplicação de ABA exógeno resulta em um aumento imediato nos níveis de LEA (IKEDA-IWAI *et al.*, 2002).

5. Relação Fluridone/ABA

O Fluridone (1-metil-3-fenil-5-[3-(trifluormetil)-fenil]-4(1H)-piridinona) é um herbicida, inibidor da phytoene desaturase (PDS), uma enzima catalítica de uma reação primária da via dos terpenos, uma via metabólica comum para a síntese de ABA, carotenóides e clorofilas (GRAPPIN *et al.*, 2000; BARREIRO *et al.*, 2007)(Figura 5).

Em *Acca sellowiana* foram observadas diferenças entre embriões somáticos e zigóticos para os padrões de síntese e degradação de hormônios endógenos AIA e ABA. Cangahuala-Inocente (2007) verificou que embriões somáticos apresentaram os maiores níveis de ABA 10 dias após o início da germinação, já o embrião zigótico 30 dias após a germinação. Este autor atribuiu à baixa taxa de conversão dos embriões somáticos em plântulas encontrados nesta espécie ao aumento nos níveis endógenos de ABA no início da germinação.

Kepczynska e Zielinska (2006) verificaram que baixas concentrações de fluridone (1 μ M) resultaram numa melhora nos índices de germinação dos embriões somáticos de *Medicago sativa*, entretanto altas concentrações de fluridone (100 μ M) resultaram em albinismo dos embriões somáticos. Müller (2008), trabalhando com a conversão de embriões somáticos de *A. sellowiana*, em meio de imersão permanente, verificou que a maior porcentagem de embriões convertidos foi obtida nos tratamentos que continham 1 μ M de fluridone, sendo que concentrações maiores não resultaram na conversão de embriões em plântulas. Estes estudos indicam que o uso de fluridone pode ser uma estratégia interessante para aumentar os índices de conversão dos embriões somáticos de *Acca sellowiana*, especialmente quando associados a outras estratégias de cultivo, como o uso de sistemas de imersão temporária.

6. Poliaminas

As poliaminas (PAs) são aminas alifáticas com carga positiva em pH neutro que desempenham papel fundamental na proliferação e diferenciação celular, bem como na síntese protéica, replicação do DNA

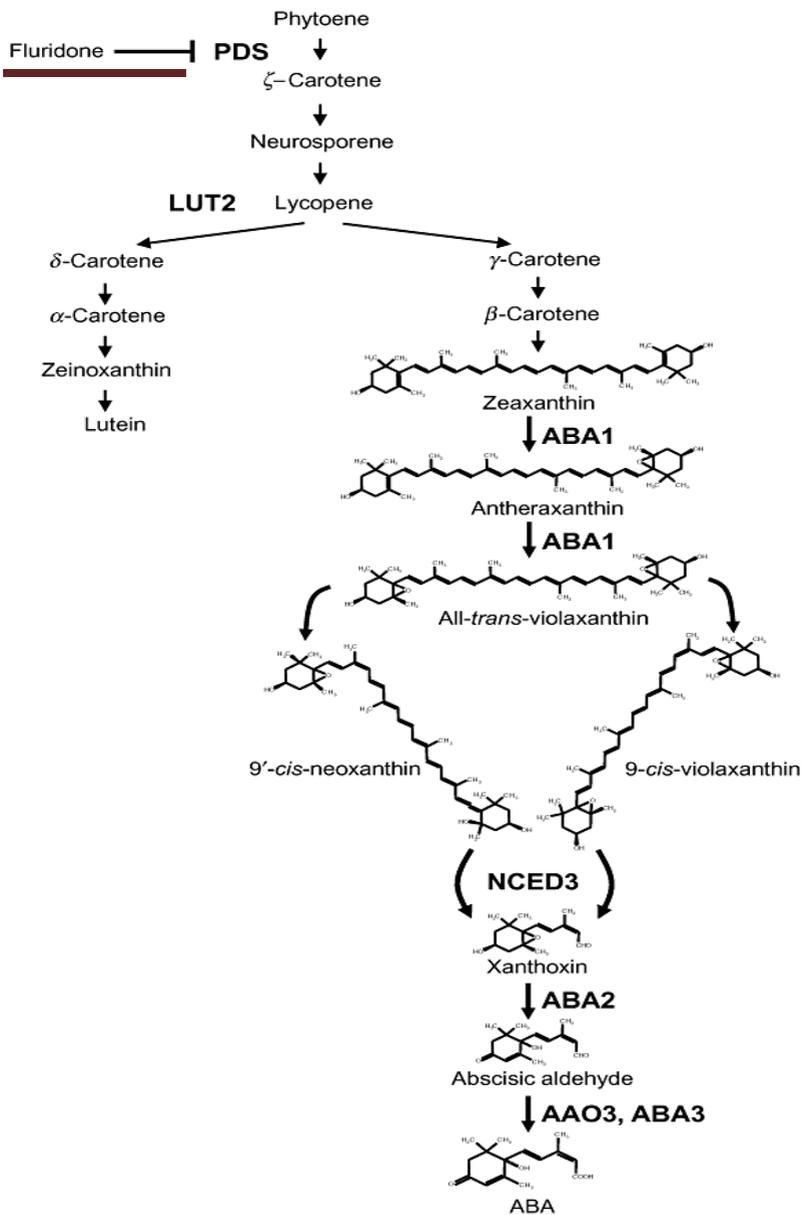


Figura 5) Via biossintética dos carotenóides e ABA. O efeito inibitório do fluridone pela phytoene desaturase (PDS) em destaque (Barreiro *et al.*, 2007).

e na resposta ao estresse hídrico de plantas (BOUCHEREAU *et al.*, 1999; PAL-BAIS e RAVISHANKAR, 2002). As PAs podem ser classificadas de acordo com seu efeito biológico: um primeiro grupo compreendendo putrescina (Put) e cadaverina (Cad), envolvidas no estímulo ao alongamento celular e formação de raízes; e um segundo grupo, incluindo espermidina (Spd) e espermina (Spm), envolvidas na divisão celular, organogênese e senescência (KUZNETSOV *et al.*, 2002). Elas são derivadas da descarboxilação de aminoácidos, sendo que os níveis de poliaminas e as taxas de crescimento dos tecidos vegetais mostraram correlação positiva, sugerindo a sua participação nos mecanismos de controle da divisão celular (BAGNI e BIONDI, 1987; MINOCHA *et al.*, 1999).

As poliaminas podem ocorrer na forma livre ou conjugada com ácidos fenólicos e moléculas de baixo peso molecular (FEHÉR *et al.*, 2003). Alguns autores tem classificado as PAs como uma nova classe de reguladores do crescimento vegetal e mensageiros hormonais secundários da proliferação e diferenciação celular (PAL-BAIS e RAVISHANKAR, 2002; JIMENEZ, 2005)

Altos teores de PAs em plantas estão associados com o incremento da divisão celular (GALSTON e FLORES, 1991). Durante a embriogênese somática de *O.catharinensis*, observaram-se um decréscimo nos teores de PAs totais entre os estádios cordiforme inicial até o estágio cotiledonar, bem como um aumento no conteúdo de PAs totais quando o embrião encontrava-se com os cotilédones completamente desenvolvidos, seguido de decréscimo no embrião maduro (SANTA CATARINA *et al.*, 2006). Em *Araucaria angustifolia*, o conteúdo de PAs variou durante a embriogênese zigótica, observando-se altos teores de Put e Spd nas fases iniciais, enquanto que, nos estágios tardios da embriogênese a Spm foi a mais abundante (ASTARITA *et al.*, 2003). Steiner *et al.* (2007) verificaram que a suplementação de PAs ao meio de cultivo de maturação de *A. angustifolia* estimulou o crescimento das linhagens celulares e também afetou significativamente o metabolismo endógenos das PAs.

Em *Acca sellowiana* o conteúdo de PAs totais variou significativamente durante o desenvolvimento do embrião zigótico (CANGAHUALA-INOCENTE *et al.*, 2009b). Neste trabalho, sugeriu-se que a Put exerceu papel importante nos estádios iniciais da embriogênese zigótica em *A. sellowiana*, enquanto que a Spm exerceu seus efeitos no final do desenvolvimento embrionário.

Comparando-se os padrões de síntese e acumulação de poliaminas, durante a embriogênese somática e zigótica de *Acca sellowiana*, observaram-se padrões diferenciados entre embriões somáticos e zigóticos, sendo que a Spd apresentou maiores teores no embrião zigótico, e a Spm prevaleceu nos embriões somáticos (CANGAHUALA-INOCENTE, 2007). Assim, sugere-se que os perfis de poliaminas podem ser utilizados como marcadores das alterações metabólicas ocorridas durante a maturação das culturas embriogênicas (FLOH *et al.*, 2007).

7.Referências bibliográficas

AMMIRATO, P.V. **Embryogenesis**. In D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato, e Y. Yamada (eds.). Handbook of Plant Cell Culture, Macmillan Publisher Co., New York, p. 82-123. 1983.

ASTARITA, L.V.; FLOH, E.I.S.; HANDRO, W. Free amino acid, protein and water content changes associated with seed development in *Araucaria angustifolia*. **Biologia Plantarum**. 47:53-59. 2003.

BAGNI, N.; BIONDI, S. **Polyamines**. pp. 113-124 in Bonga J.M. and Durzan D.J. (eds.) Cell and Tissue Culture in Forestry. Vol. 1. General Principles and Biotechnology. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster. 1987.

BARROSO, G.M.; PERÓN, V. **Myrtaceae**. In: Reserva Ecológica de Macaé de Cima, Nova Friburgo, RJ. Aspectos florísticos das espécies vasculares (M. P. M. Lima & R. R. Guedes-Bruni, eds.), Rio de Janeiro, vol. 1, p. 261-302. 1994.

BOUCHEREAU, A.; AZIZ, A.; LARHER, F.; MARTIN-TANGUY, J. Polyamines and environmental challenges: recent development. **Plant Science**. 140:103-125, 1999.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; STEINER, N.; SANTOS, M.; GUERRA, M. P. Morpho-histological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. **Protoplasma**. 224:33-40, 2004.

CANGAHULA-INOCENTE, G.C. **Caracterização morfofisiológica, bioquímica e proteômica da embriogênese zigótica e somática de goiabeira serrana (*Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret)**. Tese. Universidade Federal de Santa Catarina. 2007.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; CAPRESTANO, Clarissa Alves ; DUCROQUET, Jean Pierre Henry Joseph ; GUERRA, Miguel Pedro . Competência embriogenética em tecidos florais de *Acca sellowiana* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Biociências**. 5:87-89. 2007a.

CANGAHULA-INOCENTE, G.C.; DAL VESCO, L.L.; STEINMACHER, D.A., TORRES, A.C.; GUERRA, M.P. Improvements in somatic embryogenesis protocol in *Feijoa (Acca*

sellowiana (Berg) Burret): Induction, conversion and synthetic seeds. **Scientia Horticulturae**. 11:228–234. 2007b.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; STEINER, N.; MALDONADO, S.B. ; GUERRA, M.P. Patterns of total protein and carbohydrate accumulation during somatic embryogenesis of pineapple guava. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 44:217-224. 2009a.

CANGAHUALA-INOCENTE, G.C; SILVEIRA, V.; CAPRESTANO, C.A.; DUCROQUET, J.P.H.J.; FLOH, E.I.S.; GUERRA, M. P.. Dynamics of biochemical and morphophysiological changes during zygotic embryogenesis in *Acca sellowiana* (Berg.) Burr.. **Plant Growth Regulation**. 59:103-115. 2009b.

CANHOTO, J.M.; MESQUITA, J.F.; CRUZ, G.L.. Ultrastructural Changes in Cotyledons of Pineapple Guava (Myrtaceae) During Somatic Embryogenesis. **Annals of Botany**.78:513-521. 1996.

CAPRESTANO, C. A.; CANGAHUALA-INOCENTE, G. C. ; GUERRA, M. P. . **Competência embriogênica de cinco acessos de goiabeira serrana**. In: XVIII Congresso Brasileiro de Fruticultura. Florianópolis. Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2004.

CRUZ, G. L.; CANHOTO, J. M.; ABREU, M. A. V. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of *Feijoa sellowiana* Berg. **Plant Science**. 66:263-270. 1990.

CUTLER, S.R; RODRIGUEZ, P.L.; FINKELSTEIN, R.R.; ABRAMS, R.S. Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. **Annual Review of Plant Biology**. 61:651–79. 2010.

DAL VESCO, L. L. **Indução e controle da embriogênese somática in vitro na goiabeira serrana (Feijoa sellowiana Berg)**. Dissertação. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 1999.

DAL VESCO. L.L.; GUERRA, M.P. The effectiveness of nitrogen sources in *Feijoa* (*Feijoa sellowiana* Berg) somatic embryogenesis. **The Plant Tissue and Organ Culture**. 64: 19-25. 2001.

DUARTE, O. R.; FACHINELLO, J.C.; SANTOS FILHO, B. G. dos. Multiplicação da goiabeira serrana através de estacas semilenhosas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 27:3:513-516. 1992.

DUCROQUET, J. P. H. J.; HICKEL, E. R.; NODARI, R. O. **Goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana*)**. Séries Frutas Nativas. FUNEP: Jaboticabal-SP, 66p. 2000.

DUCROQUET, J. P.H. J. ; BARNI, E. J. ; SILVA, M. C. . **Estudo de mercado para a Goiabeira Serrana**. In: XVII Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2002, Belém. Anais do XVII Congresso Brasileiro de Fruticultura. Jaboticabal : Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2002.

DUCROQUET, J. P. H. J. ; HICKEL, E. R. Birds as pollinators of feijoa (*Acca sellowiana* Berg.). **Acta Horticulture**. 452:37-40. 1997.

DUCROQUET, J. P. H. J.; RIBEIRO, P. A. Goiaba serrana: velha conhecida, nova alternativa. **Revista Agropecuária Catarinense**. 4:3:27-29. 1991.

DUCROQUET, J. P.H. J. ; BARNI, E. J. ; SILVA, M. C. . **Estudo de mercado para a Goiabeira Serrana**. In: XVII Congresso Brasileiro de Fruticultura. Belém. Anais do XVII Congresso Brasileiro de Fruticultura. Jaboticabal : Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2003.

DUCROQUET, J. P.H. J. ; NUNES, E. C. ; GUERRA, M. P. ; NODARI, R. O.. Novas cultivares brasileiras de goiabeira serrana: SCS 414-Mattos e SCS 415-Nonante. **Revista Agropecuária Catarinense**. 21:79-82. 2008.

DUCROQUET, J. P.H. J. ; SANTOS, K. L. ; ANDRADE, E. R. ; BONETI, J. I. ; BONIN, V.; NODARI, R. O. . As primeiras cultivares brasileiras de goiabeira serrana:SCS 411 Alcântara e SCS Helena. **Agropecuária Catarinense**. 20:77-80. 2007.

DURZAN, D.J. Process control in somatic polyembryogenesis. In: HÄLLGREN, J.E. (ed.), **Proceedings of Frans Symposium**. Department of Forest Genetics and Plant Physiology. Swedish University of Agricultural Sciences 8,. pp 147. 1988.

FACHINELLO, J. .C; MIELKE, M. S.; NACHTIGAL, J. DE C. Propagação vegetativa de goiabeira serrana. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 14:3:233-236. 1992.

FEHÉR A, PASTERNAK TP, DUDITS D Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell Tissue Organ Culture** 74:201–228. 2003.

FEHÉR, A. Why Somatic Plant Cells Start to form Embryos? **Plant Cell Monographs**. 2:85-101. 2006.

FLOH, E.I.S.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.. Marcadores bioquímicos e moleculares para estudos da morfogênese in vitro. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. 13:1992-2001. 2007.

FRY, S.C.; WANGERMAN, E. Polar transport of auxin through embryos. **Cytology**. 77:313-317. 1976.

GALSTON, A. W.; FLORES, H.E. Polyamines and plant morphogenesis. In: R.D. SLOCUM; H. E. FLORES. (EDS) **Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants**. CRC Press, Boca Raton, p. 175-186, 1991.

GOVAERTS, R.; SOBRAL, M.; ASHTON, P.; BARRIE, F.; HOLST, B. K.; LANDRUM, L. R.; MATSUMOTO, K.; MAZINE, F. F.; NIC LUGHADHA, E.; PROENÇA, C.; SOARES-SILVA, L. H.; WILSON, P. G.; LUCAS, E. **World Checklist of Myrtaceae**. Kew, Royal Botanic Gardens. 455p. 2008.

GRAPPIN, P.; BOUINOT, D.; SOTTA, B.; MIGINIAC, E.; JULLIEN, M. Control of seed dormancy in *Nicotiana plumbaginifolia*: post-imbibition abscisic acid synthesis imposes dormancy maintenance. **Planta**. 210:279–285. 2000.

GRAY, W. M.; KEPINSKI, S.; ROUSE, D.; LEYSER, O.; ESTELLE, M. Auxin regulates SCFTIR1-dependent degradation of AUX/IAA proteins. **Nature**. 414:271–276. 2001.

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.

GUERRA, M.P.; DAL VESCO, L.L. DUCROQUET, J.P.H.; NODARI, R.O.; REIS, M.S. Somatic Embryogenesis in *Feijoa sellowiana*: Genotype Response, Auxinic Shock and Synthetic Seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. 13:117-128. 2001.

HEWETT, E. W. New horticultural crops in New Zealand. In. **New Crops**, New York: Wiley, p. 57-64. 1993.

IKEDA-IWAI, M., UMEHARA M, KAMADA H Embryogenesis-related genes; its expression and roles during somatic embryogenesis in carrot and Arabidopsis. **Plant Biotechnology**. 23:53-161. 2006.

IKEDA-IWAI, M.; UMEHARA, M.; SATOH, S.; KAMADA, H.. Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**. 34:107-114. 2003.

IKEDA-IWAI, M., S. SATOH, AND H. KAMADA. Establishment of a reproducible tissue culture system for the induction of Arabidopsis somatic embryos. **Journal of Experimental Botany** 53: 1575–1580. 2002.

JIANG, W.B.; YU, D.Q.. *Arabidopsis* WRKY2 transcription factor mediates seed germination and postgermination arrest of development by abscisic acid. **BMC Plant Biology**. 9:14. 2009

JIMENEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulators**. 47:91–110. 2005.

KAMADA H.; HARADA H., Changes in the endogenous level and effect of abscisic acid during somatic embryogenesis of *Daucus carota* L, **Plant Cell Physiology**. 22:1423-1429, 1981.

KEPCZYNSKA, E.; ZIELINSKA, S. Regulation of *Medicago sativa* L. somatic embryos regeneration by gibberellin A3 and abscisic acid in relation to starch content and α -amylase activity. **Plant Growth Regulation**. 49:209-217, 2006.

KONG, L.; ATTREE, S.M; FOWKE, L.C. . Changes of endogenous hormone levels in developing seeds, zygotic embryos and megagametophytes in *Picea glauca*. **Physiologia Plantarum**. 101:23-30. 1997.

KUZNETSOV, V.; RADYUKINA, N. L. AND SHEVYAKOVA, N. I. Polyamines and stress: biological role, metabolism and regulation. **Russian Journal of Plant Physiology**. 53:583-604. 2006.

LIU, C.M.; XU, Z.H.; CHUA, N.H. Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. **Plant Cell**. 5:621–630. 1993.

LUCAS, E.J.; BELSHAM, S.R.; NIC LUGHADHA, E.M.; ORLOVICH, D.A.; SAKURAGUI, C.M.; CHASE, M.W.; WILSON, P.G. Phylogenetic patterns in the fleshy-fruited Myrtaceae—preliminary molecular evidence. **Plant Systematics and Evolution**. 251:35–51. 2005.

LUCAS, E.J.; HARRIS, S.A.; MAZINE, F.F.; BELSHAM, S.R.; LUGHADHA, E.M.N.; TELFORD, A.; GASSON, P.E.; CHASE, M.W. Suprageneric phylogenetic of Myrteae, the generically richest tribe in Myrtaceae (Myrtales). **Táxon**. 56:1105-1128. 2007.

MATTOS, J.R. **A goiabeira serrana**. Instituto de Pesquisas de Recursos Naturais Renováveis Porto Alegre, 84 p. 1986.

MINOCHA, R.; DALE, R.S.; CATHIE, R.; STEELE, K.D.; MINOCHA, S.C. Polyamine levels during the development of zygotic and somatic embryos of *Pinus radiata*. **Physiologia Plantarum**. 105:155:164, 1999.

MÖLLER, B.; WEIJERS, D.. Auxin control of embryo patterning. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**. 1: a001545. 2009.

MÜLLER, T. S. **Fisiologia e Metabolismo da Embriogênese somática e zigótica de *Acca sellowiana* (Berg) Burret (Myrtaceae)**. Dissertação. Universidade Federal de Santa Catarina. 92f. 2008.

NAMBARA, E.; MARION-POLL, A. Abscisic Acid Biosynthesis and Catabolism. **Annual Review of Plant Biology**. 56:165–185. 2005.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P.; MELLER, K.; DUCROQUET, J. H. P. J. Genetic variability of *Feijoa sellowiana* germplasm. **Acta horticulturae**. 452:41-46. 1997.

OLTAMARI, A. C.; DAL VESCO, L. L.; PEDROTTI, E. L.; DUCROQUET, J. P. H. J.; NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Protocolo de micropropagação da goiabeira serrana (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). **Ciência Rural**. 30:61-68. 2000.

PAL-BAIS, H.; RAVISHANKAR, G.A. 2002 Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 69:1-34. 2002

PUGLIANO, G. La Feijoa. **Frutticoltura**. 42:51-54, 1980.

QUIROZ-FIGUEROA, F.R.; ROJAS-HERRERA, F.; GALAZ-AVALOS, R.M.; LOYOLA VARGAS, V.M. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 86:285–301, 2006.

REIS, E.; BATISTA, MT.; CANHOTO, JM. Effect and analysis of phenolic compounds during somatic embryogenesis induction in *Feijoa sellowiana* Berg. **Protoplasma** v.232, p.193–202. 2008.

SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; BALBUENA, T.S.; VIANA, A.M.; ESTELITA, M.E.M.; HANDRO W.; FLOH E.I.S. IAA, ABA, polyamines and free amino acids associated with zygotic embryo development of *Ocotea catharinensis*. **Plant Growth Regulation**, v. 49, 2006.

SEIDMANN, J. Zur kenntnis der feijoa frucht (*Acca sellowiana* [O. Berg] Burret). **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**, v. 90, n. 4, p. 112-114, 1994.

**CAPÍTULO 2 – A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Acca
sellowiana* é AFETADA PELO 2,4-D, COM EFEITOS NA
INDUÇÃO, CONVERSÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS E
NOS TEORES DE ABA, AIA, POLIAMINAS E AMINOÁCIDOS**

1. Resumo

A goiabeira serrana (*Acca sellowiana*) é uma mirtácea arbustiva, nativa dos campos sulinos do Brasil e norte do Uruguai, muito apreciada pelos seus frutos doce-acidulados e excelente aroma. Esforços de pesquisa vem sendo efetivados com ênfase no seu melhoramento genético e na aplicação das técnicas de cultura de tecidos vegetais para a sua micropropagação clonal massal, visando à captura e fixação de ganhos genéticos de plantas elite. No presente trabalho objetivou-se avaliar a resposta embriogenética dos embriões zigóticos a pulsos de auxina e como estes interferiram nos teores endógenos de AIA, ABA, poliaminas e aminoácidos. Embriões zigóticos foram inoculados meio de cultivo LPM, suplementado com vitaminas de Morel, ácido glutâmico (8 mM), maltose (3%) e ágar (0,7%). Os tratamentos consistiram em: 1) suplementação de 2,4-D (20 μ M) ao meio de cultivo; 2) pré-tratamento com 2,4-D (200 μ M) por 60 minutos; 3) meio isento de fitorreguladores. Embriões nos estádios torpedo e pré-cotiledonar foram convertidos em plântulas e foram coletadas amostras para a quantificação de ABA, AIA, aminoácidos e poliaminas livres. Tanto o pré-tratamento com 2,4-D, quanto a suplementação deste fitorregulador ao meio de cultivo resultaram na indução da embriogênese somática, entretanto o pré-tratamento resultou em indução embriogenética em menor espaço de tempo (30 e 45 dias, respectivamente). O pré-tratamento com 2,4-D resultou em uma formação média de 40 embriões somáticos por explante aos 90 dias, diferindo daquele onde o 2,4-D foi suplementado ao meio de cultivo, com 125 embriões somáticos por explante. Entretanto a conversão dos embriões somáticos em plântulas foi mais eficiente quando do pré-tratamento (32%), comparando-se a suplementação (9%). Teores de ABA nas culturas onde o 2,4-D foi suplementado ao meio de cultivo foram 1,5 vezes superiores aos teores observados em resposta ao pré-tratamento com 2,4-D. A menor concentração de ABA nas culturas submetidas ao pré-tratamento pode ter contribuído para a melhor germinação dos embriões somáticos de *A. sellowiana*. A concentração endógena de AIA foi 4,5 superior em resposta ao pré-tratamento, quando comparada aos teores observados em resposta ao 2,4-D no meio de cultura. Os níveis de aminoácidos livres foram semelhantes em todos os tratamentos. Entretanto, o pré-tratamento com 2,4-D resultou concentrações mais elevadas de GABA e de poliaminas.

2. Abstract

Pineapple guava belongs to Myrtaceae botanic family being native from southern Brazil and northern Uruguay. It is highly appreciated for its fruits with sweet-acid flavor and excellent aroma. Research efforts on this species have been directed for the capture and fixation of genetic gains associated with breeding programs and massal propagation by tissue culture techniques. The present work aimed at to analyze *in vitro* response of zygotic embryos to auxin pulse and its interference on endogenous contents of IAA, ABA, polyamines and free aminoacids. Zygotic embryos were cultured on LPM media supplemented with Morel vitamins, glutamic acid (8mM), maltose and agar. The treatments were: 1) 2,4-D-enriched (20 μ M) medium; 2) pre-treatment with 2,4-D pulse (200 μ M) for 60 minutes and 3) control treatment. Cultures were maintained in dark and embryo induction percentage and somatic embryo development were evaluated. Quantification of ABA, IAA, free aminoacids and polyamines was performed on 90 days culture. Torpedo-stage and pre-cotyledonary-stage embryos were converted into plantlets 90 days after inoculation. 2,4-D pre-treatment and constant presence resulted in somatic embryogenesis induction. Nevertheless, 2,4-D pre-treatment showed somatic embryos development in a shorter time of cultivation (30 days). In continuous presence of 2,4-D somatic embryos developed after 45 days culture. However, 2,4-D pre-treatment showed the development of 40 somatic embryos per explant on 90 days after induction, while higher values were observed in the continuous presence of 2,4-D (125 somatic embryos per explant). On the other hand, somatic embryos conversion was more efficient when 2,4-D pre-treatment (32%) was applied in comparison with continuous presence of 2,4-D (9%). The permanent presence of 2,4-D showed higher ABA levels (1,5 fold) in relation to 2,4-D pre-treatment. It could be directly related to the conversion capacity of *A. sellowiana* somatic embryos. IAA endogenous levels was on the other hand higher (4,5 fold) when 2,4-D pre-treatment was applied. Endogenous free aminoacid levels were similar in all treatments, however higher GABA and polyamine content were observed in 2,4-D pulse treatment.

3.Introdução

A embriogênese somática em *Acca sellowiana* tem sido alvo de investigação desde 1997 no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV) do CCA/UFSC. Normalmente a indução da embriogênese somática em *Acca sellowiana* ocorre em resposta à inoculação dos explantes em meio de cultura contendo 2,4-D (CRUZ *et al.*, 1990; GUERRA *et al.*, 2001; CANGAHUALA-INOCENTE *et al.*, 2004). No entanto, uma das limitações destes protocolos esta relacionada à baixa taxa de conversão dos embriões somáticos em plântulas.

Trabalhos anteriores com esta espécie sugerem que a formação de embriões somáticos anômalos, bem como a baixa taxa de conversão em plântulas, teriam conexão com a ocorrência de distúrbios fisiológicos e/ou genéticos protagonizados pela presença de 2,4-D no meio de cultura (GUERRA *et al.*, 2001; PESCADOR *et al.*, 2008). Assim, neste sistema embriogenético é comum a ocorrência de embriões anômalos que podem ser caracterizados morfológicamente como embriões fundidos, cotilédones concrecidos, com número de cotilédones diferente de dois. Entretanto outras anomalias são identificadas por microscopia ou após a conversão em plântulas e são associados à ausência de meristema apical caulinar ou aqueles com cotilédones fusionados em estágio torpedo (PESCADOR *et al.*, 2008).

Apesar de 2,4-D ser o análogo de auxina mais utilizado para a indução da embriogênese somática (Jimenez, 2005) outros autores relatam efeitos negativos do 2,4-D na embriogênese somática. Este tem sido relatado como inibição do desenvolvimento do embrião somático como também relacionado com a formação de embriões anômalos, tal como observado em *Carya illinoensis* e *Linum usitatissimum* (RODRIGUEZ e WETZSTEIN, 1998; DEDICOVÁ *et al.*, 2000). Estes efeitos tem sido ligados à ação deste fitorregulador na metilação do DNA nuclear (KAEPLER *et al.*, 2000) e na conformação das proteínas PIN, interferindo negativamente no fluxo de auxina endógena, culminando em embriões anormais (LIU *et al.*, 1993).

Tratamentos com pulsos de 2,4-D têm sido sugeridos por alguns autores (CRUZ *et al.*, 1990; GUERRA *et al.*, 2001, PESCADOR *et al.*, 2008, CANHOTO *et al.*, 2009) para diminuir o tempo de contato com esta auxina e assim diminuir o número de embriões anormais formados. Cruz *et al.* (1990) verificaram que a exposição dos explantes durante cinco dias em meio de cultura suplementado com 2,4-D foi suficiente

para promover a indução da embriogênese somática em *Acca sellowiana*, entretanto a taxa de indução embriogenética foi menor. Guerra *et al.* (2001) trabalhando também com pulsos de 2,4-D nesta mesma espécie mostraram que pulsos de duas semanas em meio de cultivo contendo esta auxina (20 μ M) resultaram em diferenciação e desenvolvimento mais rápidos dos embriões somáticos e em taxas elevadas de conversão de embriões somáticos em plântulas. Canhoto *et al.* (2009) testando pulsos de altas concentrações de 2,4-D verificaram que pulsos de uma hora em meio líquido contendo 0,9 mM diminuíram significativamente o número de embriões anormais formados.

Considerando a importância de estudar os mecanismos associados à indução e desenvolvimento de embriões somáticos em *Acca sellowiana* e suas relações com o sinal indutor 2,4-D, o presente trabalho objetivou estudar os efeitos desta auxina sobre a indução, desenvolvimento e conversão de embriões somáticos, bem como sobre os teores endógenos de ABA, AIA, poliaminas (PAs) e aminoácidos nestes embriões.

4. Material e métodos

4.1 Indução

Embriões zigóticos de *Acca sellowiana* foram obtidos de frutos do cruzamento 101x458 e desinfestados segundo os procedimentos descritos por Guerra *et al.* (2001), sendo então submetidos a três tratamentos: 1) pré-tratamento com 2,4-D (200 μM) durante 60 minutos; 2) suplementação de 2,4-D (20 μM) no meio de cultura; 3) controle (isentos de 2,4-D). Os embriões foram inoculados em tubos de ensaio de borosilicato com 15x150 mm contendo 20 ml do meio LPm (von ARNOLD e ERIKSSON, 1981), suplementado com vitaminas de Morel (MOREL e WETMORE, 1951), ácido glutâmico (8 mM), sacarose (7%) e ágar (0,7%). O meio de cultura teve o pH ajustado a 5,8 antes da adição do agente geleificante e o meio de cultura foi autoclavado 1,5 ATM a 121°C durante 15 minutos. As culturas foram mantidas em sala de cultura, na ausência de luz, com temperatura controlada de 25 °C \pm 2.

A unidade experimental foi constituída de 15 tubos de ensaio por tratamento com dois embriões zigóticos cada, arrançados em três blocos. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos completamente casualizados. Dados de indução de embriogênese somática e número de embriões formados foram coletados aos 15, 30, 60 e 90 dias de cultivo. Os embriões foram classificados nos diferentes estádios do desenvolvimento (globular, coração torpedo e cotiledonar) e também em embriões anormais (seguindo a classificação de Pescador *et al.* (2008)). Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de separação de médias SNK (5%).

Aos noventa dias, os embriões nos estádios torpedo e pré-cotiledonar foram convertidos em placas de Petri contendo 25 ml do meio LPm suplementado com vitaminas de Morel, sacarose (3%), 6-benzilaminopurina (BAP) (0,5 μM), ácido giberélico (AG₃) (1,0 μM) e carvão ativado (0,15%). A unidade experimental foi constituída de cinco placas de Petri contendo em média 35 embriões, arrançados em três blocos. Dados de porcentagem de conversão de embriões em plântulas foram coletados aos trinta dias. Foram consideradas plântulas normais aquelas que possuíam dois cotilédones, emissão de radícula e formação de clorofila; anormais as que apresentavam número de cotilédones diferente de dois, embriões concrecidos, cotilédones fusionados ou não apresentaram emissão de radícula, mas, que apresentaram a formação de clorofila; embriões brancos aqueles que não apresentaram a formação de clorofila; e oxidados. Os dados foram submetidos ao t-test (5%).

Os dados foram analisados pelo software STATISTICA®.

4.2 Extração e quantificação de AIA-ABA

A metodologia utilizada foi a descrita por Kojima (1996), com modificações. Amostras de matéria fresca (1g) foram liofilizadas e acondicionadas em microtubos em recipiente com sílica gel até a realização do teste bioquímico. O material liofilizado foi macerado sobre gelo e adicionado 3 ml de tampão de extração (Etanol 80% + 1% PVP-40). O extrato foi transferido para tubos falcon (15 ml), juntamente com 2 ml de tampão de extração utilizado para lavar o resíduo do gral. Ao extrato foram adicionado 100 µl de solução [³H] AIA e 100 µl de solução [³H] ABA, como padrões internos, para determinar o rendimento do processo. O extrato foi agitado por 1:30 h em agitador, resfriado no escuro. Após agitação foi centrifugado a 4°C, por 15 min, a 15500g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo falcon (15ml) e armazenado a -20°C. A amostra foi então concentrada em 'speed vac', a 45°C, até atingir 20% do volume inicial (1,0 mL). Os volumes das amostras foram equilibrados em balança para 3 ml com água Milli'Q®. Ácido clorídrico (HCl 1N) foi adicionado as amostras até o pH atingir 2,5. As amostras foram particionadas duas vezes, utilizando éter etílico como solvente orgânico. As fases orgânicas foram coletadas e secas em 'speed vac', a 45°C. Em seguida as amostras foram ressuspensas em 200µl de Metanol (MeOH) 100%, transferidas para tubos tipo eppendorf e armazenadas a -20°C, até o momento da análise em HPLC.

As quantificações de ABA e AIA foram realizadas em HPLC em fase reversa, com coluna C18 (Shimadzu SHIM-pack CLC ODS). Como eluentes utilizou-se a solução 10% MeOH/0,5% HAc (ácido acético glacial) (eluente A) e metanol 100% (eluente B). O detector de UV foi ajustado em 254nm, para detecção de ABA. Para detecção de AIA, o detector de fluorescência foi ajustado para excitação em 280nm, e emissão em 350nm. A coluna foi equilibrada com 20% do eluente B, e a temperatura do forno para 40°C. O fluxo dos eluentes foi de 1ml min⁻¹ e o gradiente de metanol foi ajustado para atingir 100% em 60 min. Foram injetados 40 µl de amostra. As frações contendo AIA e ABA foram coletadas e analisadas por cintilação líquida (PACKARD modelo Tri-carb 2100 TR), para estimativa de perdas. As áreas e os tempos de retenção do AIA e do ABA foram comparadas com concentrações padrões destes hormônios.

Os dados foram analisados pelo software STATISTICA® para Windows versão 7.0, utilizando três repetições de amostra biológica

para cada tratamento. Os tratamentos foram comparados pelo teste SNK para determinar diferenças significativas entre os tratamentos. ($P < 0.05$).

4.3 Extração e quantificação de poliaminas

A metodologia usada foi a descrita por Silveira *et al.* (2004), com modificações. A matéria fresca (200 mg) dos três tratamentos foram liofilizados e acondicionados com sílica gel até a realização do teste bioquímico. Os materiais liofilizados foram macerados com 1,6ml de ácido perclórico 5% (PCA). O extrato foi colocado em tubos tipo eppendorf 2 ml, e mantidos em gelo durante 1h, sendo posteriormente centrifugado a 20000g durante 2 min a 4°C, obtendo-se o sobrenadante que continha as PAs livres. A dansilação das poliaminas livres deu-se misturando 40 µl da amostra de poliaminas, 20 µl de Diaminoheptano (DAH) 0,05 mM DAH como padrão interno, 50 µl de solução saturada de carbonato de sódio e 100 µl de solução de cloreto de Dansyl (5mg/ml de acetona-1,8mM). Após a homogeneização as amostras foram incubadas no escuro por 50 min a temperatura de 70°C. O excesso de cloreto de dansil foi convertido em dansil-prolina adicionando-se 25 µl de solução de prolina (100 mg.ml⁻¹), posteriormente incubados no escuro por 30 min em temperatura ambiente. Em seguida as amostras de PAs foram particionadas com 200µl de tolueno, sendo a fase apolar (tolueno), que continha as PAs foi coletada (175µl) e seca sobre jato de nitrogênio líquido, sendo ressuspensa em 175 µl de acetonitrila e armazenada em freezer -20°C até o momento da corrida.

A identificação e quantificação das PAs foram realizadas utilizando-se HPLC com coluna C18 de fase reversa (Shimadzu SHIM-pack CLC ODS). Como eluentes utilizou-se acetonitrila pura (orgânica) e acetonitrila 10% (inorgânica), com pH ajustado 3,5 com HCl 1N. A coluna foi calibrada com 65% de acetonitrila, com um fluxo de 1ml/min, atingindo 100% aos 25 min, permanecendo por 35 min. O detector de fluorescência foi ajustado para excitação de 340 nm e emissão de 510 nm. Foram injetados 20 µl de amostras. As áreas e os tempos de retenção de cada PA foram avaliadas por comparação com padrões de concentrações de PAs conhecidas: Put, Spd, Spm, Cad e DAH (padrão interno)

Os dados foram analisados pelo software STATISTICA® para Windows versão 7.0, utilizando três repetições de amostra biológica para cada tratamento. Os tratamentos foram comparados pelo teste SNK para determinar diferenças significativas entre os tratamentos. ($P < 0.05$).

4.4 Extração e quantificação de aminoácidos

A metodologia usada foi a descrita por Astarita *et al.* (2003). A matéria fresca (200 mg) dos três tratamentos foram liofilizados e acondicionados com sílica gel até a realização do teste bioquímico. Os materiais liofilizados foram macerados em 6 ml de etanol 80%. Com o auxílio de uma pipeta o material foi transferido para tubos falcons (15ml) e secos em 'speed vac' a 45°C até serem reduzidas a 0,6 ml. Em seguida as amostras foram ressuspensas em 2 ml com água milli-Q® e centrifugadas a 15.000g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e transferido para microtubos de 2 ml, filtrados em membranas 0,2 µm e armazenados em freezer -20°C, para subseqüentes análises. Alíquotas de 20µl do filtrado e 60 µl da solução de OPA-borato, utilizadas para a derivatização dos aminoácidos á temperatura ambiente foram homogeneizados por 2 min e a seguir analisados por HPLC. A identificação e quantificação dos aminoácidos por HPLC foram realizadas utilizando uma coluna de C18 de fase reversa (Shimadzu Shim-pack CLC ODS). Foram utilizados como solvente metanol 65% e uma solução de acetato de sódio 50mM, fosfato de sódio 50 mM, metanol (20ml. L⁻¹) e tetrahidrofurano (20 ml. L⁻¹) com pH ajustado para 8,6 com acido acético glacial. A mudança na proporção de metanol 65% em relação ao outro solvente definiu o gradiente de corrida, sendo o gradiente de metanol 65% programado para 15% durante os primeiros 34 min, de 15 a 35% entre os 34 e 55 min, de 35 a 85% entre 55 e 75 min, de 75 a 100% entre 75 e 85 min e 100% até 100 min, com fluxo de 1ml.min⁻¹, a 40°C. O detector de fluorescência foi ajustado para excitação de 250nm e emissão de 480nm. Foram injetados 20µL da solução derivatizada com OPA. As áreas e o tempo de retenção de cada aminoácido foram comparados com aminoácidos padrão em concentrações conhecidas.

Os dados foram analisados pelo software STATISTICA® para Windows versão 7.0, utilizando três repetições de amostra biológica para cada tratamento. Os tratamentos foram comparados pelo teste SNK para determinar diferenças significativas entre os tratamentos. (P< 0.05).

5. Resultados e discussão

5.1 Indução da embriogênese somática

Embriões somáticos no estágio globular, coração, torpeda ou cotiledonar (Figura 6), foram observados após 30 dias em cultivo em resposta ao pré-tratamento com 2,4-D (Figura 6b). No tratamento onde o 2,4-D foi suplementado ao meio de cultivo, embriões somáticos em todos os estágios foram observados somente após 45 dias em cultura (Figura 6c). No tratamento controle não ocorreu a indução da embriogênese somática, e os embriões zigóticos germinaram (Figura 6d).

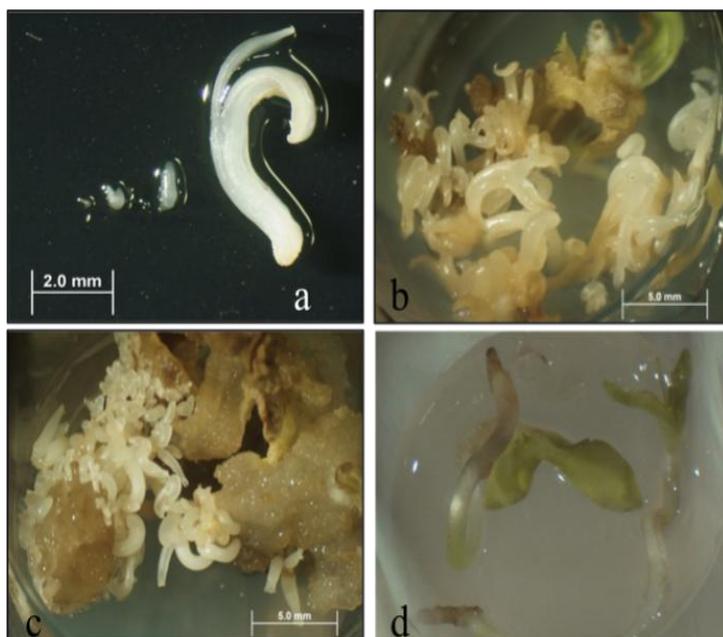


Figura 6) a) Embriões somáticos de *A. sellowiana* em diferentes estágios de desenvolvimento (globular, coração, torpeda e cotiledonar); b) Embriões somáticos induzidos pelo pré-tratamento com 2,4-D (200 μ M) durante 60 minutos, após 90 dias em cultura; c) Embriões somáticos induzidos em meio de cultura suplementado com 2,4-D (20 μ M) após 90 dias em cultura; d) Embriões zigóticos germinados em meio de cultura isento de 2,4-D.

A taxa de indução de embriogênese somática foi de 100% nos dois tratamentos que receberam a suplementação de 2,4-D, sugerindo assim que o pré-tratamento de 60 minutos foi eficaz para induzir a embriogênese somática em *Acca sellowiana*. De forma similar, Guerra *et al.* (2001) verificaram que pulsos de duas semanas com 20 μM de 2,4-D e posterior transferência das culturas para um meio isento deste fitorregulador foram eficazes para induzir a embriogênese somática em magnitudes similares àsquelas observadas em meio de cultura com presença contínua deste fitorregulador. Em contraste, Canhoto *et al.* (2009) encontraram que a taxa de indução da embriogênese somática utilizando pulsos de 2,4-D foi menor quando comparado ao resultado obtido em meio de cultura no qual o 2,4-D foi mantido ao longo do período de cultivo.

Tem sido postulado que a reprogramação gênica dos tecidos do explante e que culmina com a indução da embriogênese somática esta associada à metilação de DNA nuclear, a qual seria modulada pelo 2,4-D (DE KLERK *et al.*, 1997; PESCADOR, 2004; CANGAHUALA-INOCENTE, 2007). Adicionalmente, em *Arabidopsis thaliana*, tratamento com 2,4-D (1 μM) durante uma hora aumentou a expressão de 148 genes e diminuiu a expressão de outros 85 genes (RAGHAVAN *et al.*, 2005). Assim este estudo indica que o 2,4-D não só modula a expressão das rotas da auxina, etileno e ABA, mas também regula uma grande variedade de outras funções celulares.

No presente trabalho a presença contínua do 2,4-D no meio de cultura resultou um número de embriões somáticos três vezes maiores do que aquele observado em resposta ao pré-tratamento com esta auxina (Figura 7). Esta diferença no número de embriões formados está possivelmente ligada à constante indução da embriogênese pelo 2,4-D. Esta hipótese é corroborada pelo trabalho de Cangahuala-Inocente *et al.* (2004) no qual se demonstrou a origem do processo embriogenético a partir de células da epiderme do embrião zigótico e com o passar do tempo esses embriões somáticos dão origem a novos embriões somáticos, num processo de embriogênese repetitiva.

Aos noventa dias em cultura os embriões somáticos foram classificados em quatro estágios de desenvolvimento (globular, coração, torpedo e cotiledonar) e também em anormais, segundo a classificação de Pescador *et al.* (2008). Maior quantidade de embriões somáticos em estágios de desenvolvimento mais avançados foram observados em resposta ao pré-tratamento com 2,4-D quando

comparada com os resultados obtidos com a presença contínua do 2,4-D no meio de cultura (

Figura 8). Aos noventa dias, os embriões somáticos induzidos com o pré-tratamento de 2,4-D encontravam-se majoritariamente no estágio torpeda (37,2%), seguido do estágio cotiledonar (31,2%). Já no tratamento com presença contínua do 2,4-D no meio de cultura, os embriões somáticos mostraram uma progressão mais lenta e somente 4% dos embriões encontravam-se no estágio cotiledonar. O número de embriões anormais nos dois tratamentos também diferiu, sendo que o tratamento com presença contínua do 2,4-D no meio de cultura observou-se uma maior formação de embriões somáticos anormais (13,4%), quando comparado àqueles submetidos ao pré-tratamento (4,2%).

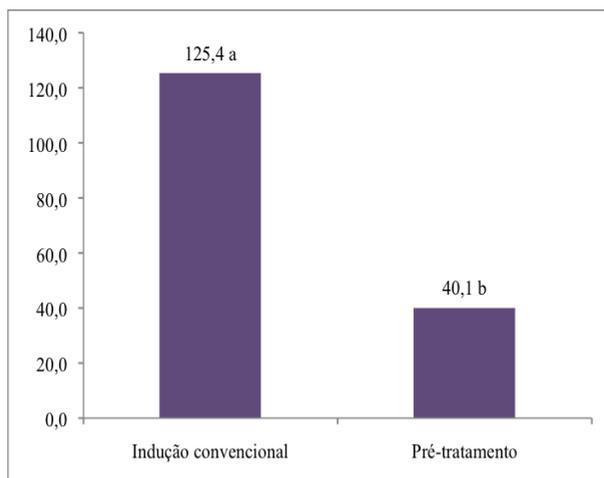


Figura 7) Número de embriões somáticos de *Acca sellowiana*, aos 90 dias de cultivo, obtidos em resposta à indução convencional, pela suplementação de 2,4-D ao meio de cultivo (20 μ M) e em resposta ao pré-tratamento com 2,4-D (200 μ M por 60 minutos) após 90 dias em cultura e. Letras diferentes diferem segundo o t-teste (5%). CV: 5,24%.

Guerra *et al.* (2001) também verificaram que um menor tempo de exposição ao 2,4-D resultou numa rápida diferenciação e desenvolvimento dos embriões somáticos de *Acca sellowiana*. Este desenvolvimento mais rápido dos embriões quando da exposição ao 2,4-D por um menor período de tempo pode estar associado ao processo de

maturação dos embriões somáticos, que se dá mais eficientemente na ausência de 2,4-D. Vários protocolos de embriogênese direta utilizam deste artifício de mudança de meio de cultivo para um meio isento ou com concentrações menores deste fitorregulador (FERREIRA *et al.*, 2005; BAKER e WETZSTEIN, 1994). Assim, a elaboração de um protocolo baseado em pulso de fitorregulador, no qual não haveria a necessidade de subcultivos seria mais eficaz, uma vez que poderia reduzir a manipulação das culturas.

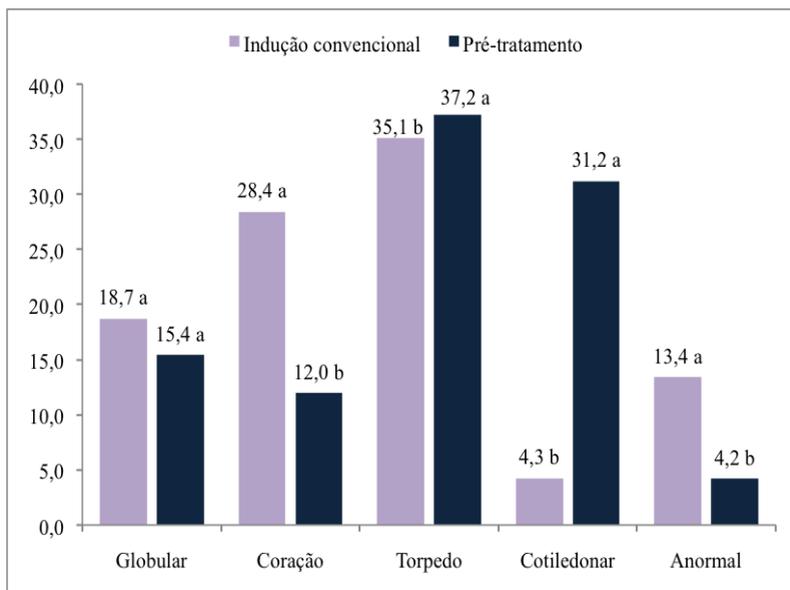


Figura 8) Distribuição, em percentual, dos estádios de desenvolvimento (globular, coração, torpedo, cotiledonar e com aparência anormal) dos embriões somáticos de *Acca sellowiana*, aos 90 dias de cultivo, obtidos em resposta ao pré-tratamento com 2,4-D (200 μ M, 60 min.) e à suplementação de 2,4-D no meio de cultivo (20 μ M). Letras diferentes, nas categorias, diferem segundo o t-teste (5%). CV: Globular 7,06%; Coração 6,16%; Torpedo 1,78%; Cotiledonar 2,2%; Anormal 10,4%.

5.2 Conversão dos embriões somáticos em plântulas

A conversão dos embriões somáticos obtidos foi realizada aos 90 dias. Somente embriões considerados morfologicamente normais e nos estádios de desenvolvimento torpedo ou pré-cotiledonar foram utilizados para a conversão em plântulas. Os embriões oriundos do pré-

tratamento foram convertidos em plântulas, com emissão de radícula, dois cotilédones e formação de clorofila, com maior eficiência (37%) quando comparados com aqueles oriundos de indução convencional (9%) (

Figura 9).

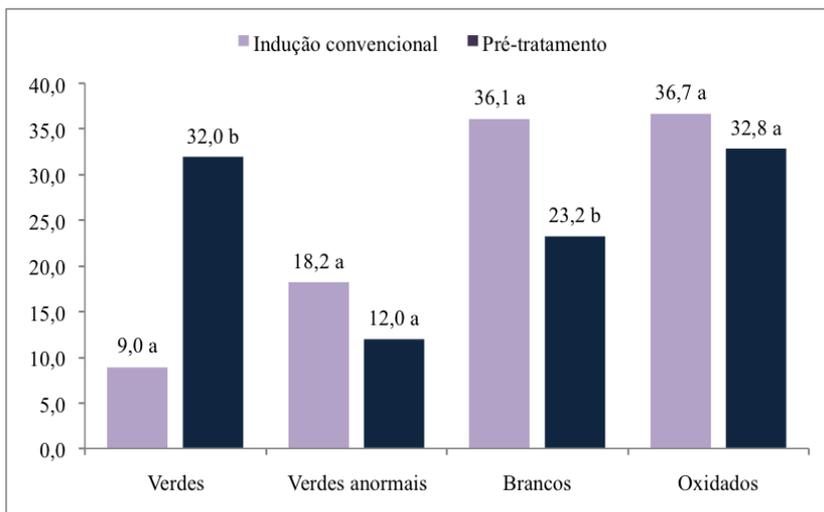


Figura 9) Distribuição dos embriões somáticos de *Acca sellowiana* convertidos em plântulas (plântulas normais, plântulas anormais, embriões não convertidos brancos e embriões não convertidos oxidados), aos 30 dias de cultivo, obtidos em resposta ao pré-tratamento com 2,4-D (200 μ M, 60 min.) e à indução convencional com a suplementação de 2,4-D ao meio de cultura (20 μ M). Letras diferentes nas categorias diferem segundo o t-teste (5%). CV: Verdes 11,97%; Verdes anormais 8,54%; Brancos 16,25%; 13,39%.

Foi observada também a conversão de embriões anormais, onde houve a formação de clorofila, porém apresentaram número de cotilédones diferente de dois, cotilédones fusionados ou somente emissão de radícula, em ambos tratamentos (12% em resposta ao pré-tratamento e 18% em resposta à indução convencional) (Figura 10). Estes resultados estão em sintonia com aqueles reportados por Pescador *et al.* (2008) que verificaram que algumas anormalidades dos embriões somáticos de *Acca sellowiana* não podem ser detectadas morfologicamente e sim por meio de avaliações histológicas.



Figura 10) Embriões somáticos anormais e plântulas de *Acca sellowiana*: a) Plântula com somente um cotilédone; b) Plântulas com cotilédones fusionados; c) Presença de três cotilédones; d) Plântulas derivadas de embriões normais.

A maturação é a etapa da embriogênese somática onde ocorre a expansão de órgãos de reserva e cotilédones concomitantemente com o acúmulo dos principais compostos de reserva e a preparação do embrião para a tolerância à desidratação, quiescência e conversão (THOMAS, 1993; MORDHORST *et al.*, 1997; SALLANDROUZE *et al.*, 2002, von ARNOLD *et al.*, 2002).

Trabalhos anteriores com *Acca sellowiana* evidenciaram que a maturação dos embriões somáticos é o fator crítico limitante no estabelecimento de protocolos de embriogênese somática nesta espécie. De fato, a maturação de embriões somáticos é considerada o principal entrave em várias espécies lenhosas, tais como *Araucaria angustifolia* (STEINER, 2009), *Bactris gasipaes* (STEINMACHER *et al.*, 2007; STEINMACHER, 2010) e *Pinus bungeana* (ZHANG *et al.*, 2007), assim novos estudos devem ser realizados com o intuito de se obter embriões mais aptos a conversão.

5.3 Níveis endógenos de ABA e AIA

No presente trabalho, embriões somáticos induzidos com um pré-tratamento de 2,4-D apresentaram uma capacidade de conversão significativamente maior que o tratamento de presença contínua de 2,4-D. Esta alta taxa de conversão de embriões somáticos em plântulas pode estar associada aos baixos teores endógenos de ABA das culturas

induzidas pelo pré-tratamento com 2,4-D ($5.635,4 \mu\text{g.g de MF}^{-1}$), quando comparada aos resultados obtidos em resposta aos demais tratamentos (Figura 11), aos noventa dias de cultivo. No tratamento controle, no qual não houve a exposição ao 2,4-D, os teores de ABA ($42.005,5 \mu\text{g.g de MF}^{-1}$) foram expressivamente maiores aos observados nos demais tratamentos.

Estudos com *Galium aparine* mostraram que auxinas estão envolvidas na acumulação de ABA (KRAFT, 2007) podendo aumentar a expressão do gene que codifica a enzima 9'-cis-epóxi carotenóide dioxigenase, um regulador chave na biossíntese de ABA (HANSEN e GROSSMANN, 2000; KRAFT, 2007). Assim, no presente trabalho, a exposição contínua das culturas ao 2,4-D poderia justificar os teores mais elevados de ABA (1,5 vezes maior), quando comparado com aqueles observados nas culturas que receberam pré-tratamento de 2,4-D (Figura 11).

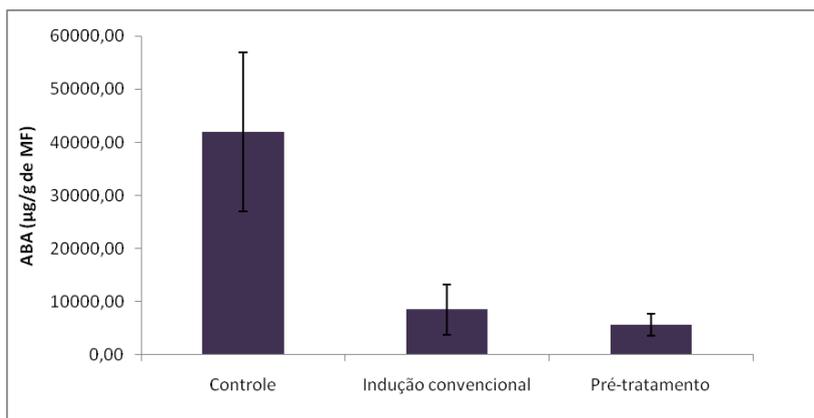


Figura 11) Teores endógenos de ABA ($\mu\text{g/g de MF}$) em culturas controle, induzidas convencionalmente com $20 \mu\text{M}$ de 2,4-D e induzidas por pré-tratamento com $200 \mu\text{M}$, 60 min de 2,4-D de *Acca sellowiana*, aos noventa dias de cultivo (Média \pm desvio padrão).

Os maiores teores da auxina endógena, ácido indol acético (AIA), foram encontrados nos explantes cultivados na ausência de 2,4-D (controle) (Figura 12). Entretanto, em condições de cultivo para a indução de embriogênese somática, os teores de AIA foram superiores naquelas culturas induzidas pelo pré-tratamento quando comparado com os teores observados em resposta à indução convencional (5,9 vezes maior).

Altos teores endógenos de auxina estão relacionados com a formação de embriões normais em *Arabidopsis*. Isto porque o transporte polar de auxina é responsável pela polarização dos embriões e consequente formação normal destes (LIU *et al.*, 1993). No presente trabalho, essa observação pode ser correlacionada com a porcentagem maior de embriões somáticos com fenótipos anômalos ocorrida em resposta à presença contínua de 2,4-D no meio de cultura (Figura 10), os quais apresentaram teores menores de auxina endógena (Figura 12). As taxas mais elevadas de conversão dos embriões somáticos observadas em resposta ao pré-tratamento com 2,4-D poderiam estar relacionadas com a diferença dos teores de AIA e ABA encontrados. Em *Quercus petraea* uma alta capacidade de conversão dos embriões somáticos foi associada a uma alta concentração de AIA e a uma baixa concentração de ABA (CVIKROVÁ *et al.*, 1997), similar aos resultados observados no presente estudo.

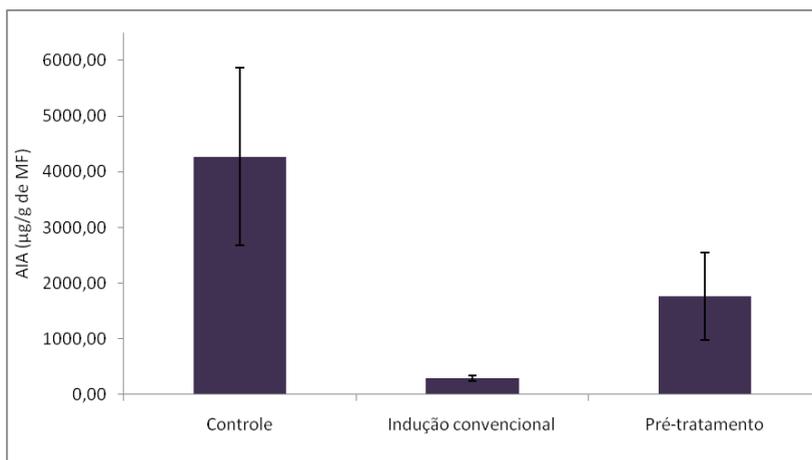


Figura 12) Teores endógenos de AIA (µg/g de MF) em culturas controle, induzidas convencionalmente e aquelas induzidas através do pré-tratamento com 2,4-D de *Acca sellowiana*, aos noventa dias de cultivo. (Média ± desvio padrão).

5.4 Aminoácidos

Teores mais elevados de aminoácidos livres totais foram encontrados em resposta ao tratamento no qual o 2,4-D esteve continuamente presente no meio de cultura (28532,4 µg.g⁻¹ de MF),

seguido do tratamento controle (isento de 2,4-D) (24872,4 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de MF) e do pré-tratamento com 2,4-D (20889,9 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de MF) (Tabela 2).

No tratamento isento de 2,4-D, os aminoácidos histidina, triptofano, isoleucina, ornitina, lisina e cisteína não foram observados. Nas culturas derivadas do pré-tratamento com 2,4-D, os aminoácidos alanina, ornitina, lisina e cisteína não foram detectados e no tratamento com presença contínua de 2,4-D não foram detectados os aminoácidos arginina, triptofano, metionina, valina, isoleucina e leucina.

Ornitina, lisina e cisteína foram exclusivamente encontradas nas culturas com pré-tratamento de 2,4-D. Por outro lado, triptofano e isoleucina foram detectados somente nas culturas com a presença contínua de 2,4-D. No entanto, não foram detectadas diferenças significativas entre as concentrações de todos aminoácidos avaliados

A suplementação de ácido glutâmico ao meio de cultura poderia explicar os altos teores de glutamina encontrados em todos os tratamentos (Tabela 3). O ácido glutâmico, encontrado em baixa concentração em todos os tratamentos é o precursor da glutamina e serve de fonte de nitrogênio para a biossíntese de purinas e pirimidinas (BOHINSKI, 1991).

A ornitina é convertida em arginina através ciclo da ureia (LUDWIG, 1993). A não detecção de ornitina nas culturas derivadas do tratamento controle e nas culturas com a presença contínua de 2,4-D no meio de cultura pode estar associado à detecção de arginina nestes.

Os teores do ácido γ -aminobutírico (GABA) foram maiores nas culturas derivadas do pré-tratamento com 2,4-D, em comparação com os teores observados nas culturas nas quais o 2,4-D esteve continuamente presente no meio de cultura. A acumulação deste aminoácido em diversos tecidos está relacionada com condições de estresse físico e/ou químico (BOWN e SHELP, 1997). Cangahuala-Inocente *et al.* (2009) observaram que o GABA foi o quarto maior aminoácido presente em embriões zigóticos de *A. sellowiana* entre 75 e 90 dias após a polinização, e seus teores decresceram posteriormente. A presença deste aminoácido nesta fase de desenvolvimento embrionário sugere um papel importante do mesmo na fase de maturação embrionária de *A. sellowiana*.

Booz *et al.* (2009) avaliaram a suplementação de GABA (10 μM) no meio de indução da embriogênese somática em *Acca sellowiana* encontraram um menor percentual de formação de embriões com cotilédones fusionados em relação menores concentrações deste aminoácido ou sua ausência, entretanto a suplementação não influenciou na porcentagem de embriões convertidos.

Tabela 1. Teores de aminoácidos livres ($\mu\text{g/g}$ de matéria fresca) em culturas de *A. sellowiana* isentas de 2,4-D (controle); induzidas com 2,4-D (20 μM) (indução convencional) e induzidas por pré-tratamento com 200 μM de 2,4-D por 60 min, aos noventa dias de cultivo. Letras diferentes na linha diferem segundo o teste SNK 5%

Aminoácido	Tratamento		
	Controle	Indução convencional	Pré-tratamento
Ác. Aspártico	48,18 \pm 11,84	41,71 \pm 26,93	9,61 \pm 4,39
Ác. Glutâmico	124,8 \pm 22,59	67,06 \pm 42,33	117,44 \pm 65,84
Asparagina	3.028,5 a \pm 709,47	2.610,5 b \pm 1612,2	197,9 b \pm 183,93
Serina	20,52 \pm 33,08	13,34 \pm 16,17	7,06 \pm 4,28
Glutamina	20.447,80 \pm 819,09	24.459,62 \pm 15858,9	20.303,19 \pm 7490,92
Histidina	Nd*	319,63 \pm 407,97	35,1 \pm 30,21
Glicina	1.138,5 a \pm 137,42	992,82 a \pm 572,48	136,25 b \pm 37,86
Arginina	18,20 a \pm 3,08	6,1b \pm 5,68	Nd*b
Treonina	26,05 a \pm 9,63	5,45 b \pm 4,36	6,34 b \pm 1,64
Alanina	12,22 a \pm 4,18	Nd*b	1,68 b \pm 1,33
GABA	3,41 \pm 5,2	0,32 \pm 0,3	51,41 \pm 76,27
Tirosina	1,12 \pm 1,57	4,3 \pm 5,87	0,21 \pm 0,36
Triptofano	Nd*	2,08 \pm 2,49	Nd*
Metionina	1,38 \pm 0,95	6,05 \pm 5,38	Nd*
Valina	0,47 \pm 0,72	0,94 \pm 1,18	Nd*
Fenilalanina	Nd*	Nd*	Nd*
Isoleucina	Nd*	0,87 \pm 1,51	Nd*
Leucina	1,11 \pm 1,93	1,52 \pm 2,04	Nd*
Ornitina	Nd*b	Nd*b	11,44 a \pm 6,36
Lisina	Nd*b	Nd*b	10,70 a \pm 6,49
Cisteína	Nd*	Nd*	1,55 \pm 0,23
Total	24872,36	28532,41	20889,9

Nd* = Não detectado

Tabela 2. Comparação das porcentagens de aminoácidos livres em culturas controle não embriogênicas, induzidas convencionalmente e aquelas induzidas através do pré-tratamento com 2,4-D de *Acca sellowiana*, aos noventa dias de cultivo.

Aminoácido	Tratamento		
	Controle	Indução convencional	Pré-tratamento
Ac. Aspártico	0,194	0,146	0,046
Ac. Glutâmico	0,502	0,235	0,562
Asparagina	12,176	9,150	0,948
Serina	0,082	0,047	0,034
Glutamina	82,211	85,726	97,191
Histidina	Nd*	1,120	0,168
Glicina	4,578	3,480	0,652
Arginina	0,073	0,021	Nd*
Treonina	0,105	0,019	0,030
Alanina	0,049	Nd*	0,008
GABA	0,014	0,001	0,246
Tirosina	0,005	0,015	0,001
Triptofano	Nd*	0,007	Nd*
Metionina	0,006	0,021	Nd*
Valina	0,002	0,003	Nd*
Fenilalanina	Nd*	Nd*	Nd*
Isoleucina	Nd*	0,003	Nd*
Leucina	0,004	0,005	Nd*
Orinitina	Nd*	Nd*	0,055
Lisina	Nd*	Nd*	0,051
Cisteína	Nd*	Nd*	0,007

Nd* = Não detectado

5.5 Poliaminas endógenas

Os teores de poliaminas endógenas livres totais foram mais elevados naquelas culturas derivadas do tratamento controle (isento de 2,4-D) e não diferiram daqueles teores observados nas culturas submetidas ao pré-tratamento com 2,4-D, diferindo, entretanto, dos teores observados em culturas nas quais esta auxina esteve presente continuamente no meio de cultura (Figura 13).

A putrescina teve sua maior concentração naquelas culturas induzidas pelo pré-tratamento com auxina, diferindo dos teores observados nos demais tratamentos. A espermidina também apresentou maior concentração nas culturas derivadas do pré-tratamento com 2,4-D, seguido dos resultados obtidos nas culturas derivadas do tratamento controle (isento de 2,4-D) e daquelas culturas induzidas com a presença contínua do 2,4-D no meio de cultura. A espermina apresentou maior concentração nas culturas controle, seguido dos teores observados nas culturas derivadas do pré-tratamento com 2,4-D, os quais, por sua vez, não diferiram dos teores encontrados nas culturas nas quais o 2,4-D esteve continuamente presente no meio de cultura.

Segundo Andersen *et al.* (1998) o aumento dos níveis de poliaminas nos tecidos *in vitro* pode causar uma redução nos teores de etileno. De fato, as vias biossintéticas para síntese de poliaminas e de etileno competem por um precursor comum, o S-adenosil metionina (ACC) (ALPEBAUM *et al.*, 1981). Em tecidos cultivados na presença de auxinas é esperado um aumento da síntese de etileno, já que as auxinas promovem a síntese de ACC (CHAE *et al.*, 2000). Etileno é um hormônio ligado a diferentes aspectos da morfogênese, e sinalizador principal da senescência, de forma que sua presença em menores concentrações possibilitaria melhor desenvolvimento dos explantes *in vitro*. Na embriogênese somática de pupunha, baixas concentrações de nitrato de prata (um potente bloqueador do etileno) incrementou a indução da embriogênese somática (STEINMACHER *et al.*, 2007).

A putrescina tem sido relacionada com o estímulo da divisão celular (HAVELANGE *et al.*, 1996; LIU e MORIGUCHI, 2007). Em *Catharantus roseus*, Minocha *et al.* (1990), verificaram que ao se inibir a síntese de putrescina se inibiu também a divisão celular. No presente estudo, teores de putrescina foram 4,2 vezes maiores nas culturas derivadas do pré-tratamento com 2,4-D em comparação com os teores encontrados nas culturas nas quais o 2,4-D esteve continuamente

presente no meio de cultura. A putrescina é sintetizada a partir do aminoácido arginina pela ação da arginina carboxilase (SLOCUM *et al.* 1984). No presente estudo a arginina não foi detectada nas culturas derivadas do pré-tratamento com 2,4-D e onde a concentração de putrescina foi superior.

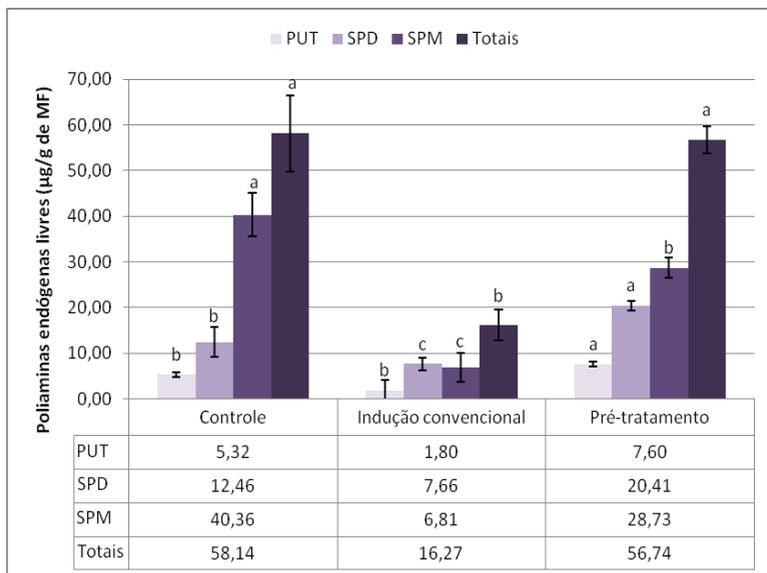


Figura 13) Poliaminas endógenas livres ($\mu\text{g/g}$ de MF) nas culturas de *Acca sellowiana* derivadas do tratamento controle não embriogênicas, induzidas convencionalmente e aquelas induzidas através do pré-tratamento com 2,4-D, aos noventa dias de cultivo. Dados apresentados em Média \pm desvio padrão. Letras diferentes na série diferem segundo o teste SNK (5%)

Outras poliaminas, espermina e espermidina, atuam na diferenciação celular (GALSTON e KAUR-SAWHNEY, 1990) e são sintetizadas a partir da putrescina pela ação da espermidina sintase (SLOCUM *et al.*, 1984). A concentração endógena de espermidina foi 2,7 vezes maior e a de espermina foi 4,2 vezes maior nas culturas nas culturas derivadas do pré-tratamento com 2,4-D em comparação com os teores observados nas culturas derivadas do tratamento em que o 2,4-D esteve continuamente presente no meio de cultura.

A razão $\text{Put.}(\text{Spm}+\text{Spd})^{-1}$ foi maior (0,15) em resposta ao pré-tratamento com 2,4-D, não diferindo dos outros tratamentos (Figura 14). A razão $\text{Put.}(\text{Spm}+\text{Spd})^{-1}$ tem sido enfatizada em muitos estudos como

fator fundamental para a resposta morfo genética (SHOEB *et al.*, 2001; LIU e MORIGUCHI; 2007; DIAS *et al.*, 2009).

A poliamina cadaverina foi detectada em todos os tratamentos, sendo que no tratamento onde houve a indução por pré-tratamento somente em uma das três amostras analisadas (dados não apresentados). Esta poliamina, normalmente presente em leguminosas, é derivada da lisina pela ação da lisina decarboxilase (KUSANO *et al.*, 2008) e sua função em plantas ainda não foi estabelecida (ALCAZÁR *et al.*, 2010).

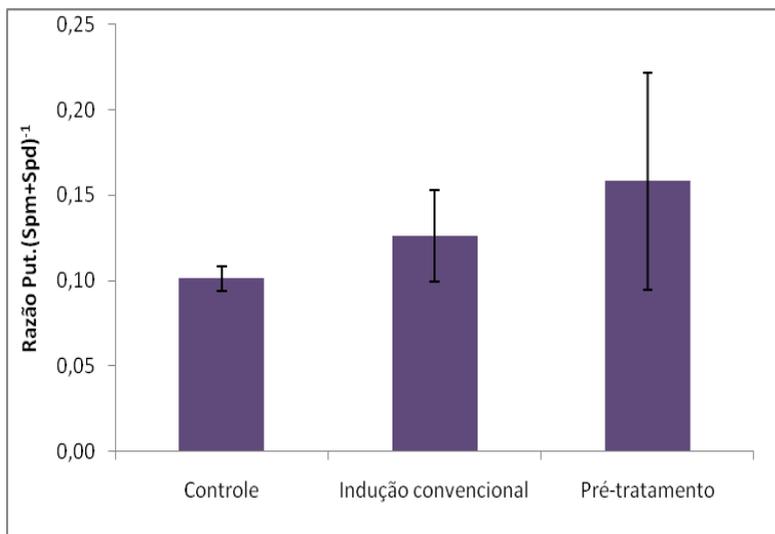


Figura 14. Razão Put.(Spm+Spd)⁻¹ em culturas não embriogênicas, induzidas convencionalmente e aquelas induzidas através do pré-tratamento com 2,4-D de *Acca sellowiana*, aos noventa dias de cultivo (Média ± desvio padrão).

Os resultados do presente trabalho corroboram com os resultados obtidos nos trabalhos anteriores (CRUZ *et al.*, 1990; GUERRA *et al.*, 2001) com esta mesma espécie. Neste trabalho a indução com banho de 2,4-D demonstrou maiores índices de conversão de embriões em plântulas, menores taxas de embriões anormais e maiores níveis de GABA endógeno, sendo uma forma eficaz de indução embriogênica em *Acca sellowiana*.

6.Referências bibliográficas

ALCÁZAR, R.; ALTABELLA, T.; MARCO, F.; BORTOLOTTI, C.; REYMOND, M.; KONCZ, C.; CARRASCO, P.; TIBURCIO, A.F.. Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. **Planta**. 231:1237-1249. 2010.

ALPEBAUM, A; BURGOON, A.C.; ANDERSON, J.D; LIBERMAN, M. BENARIE, R.; MATTOO, A.K. Polyamines inhibit biosynthesis of ethylene in higher plant tissue and fruit protoplasts. **Plant Physiology**. 68:453-456. 1981.

ANDERSEN, S.E; BASTOLA, D.R.; MINOCHA, S.C. Metabolism of polyamines in transgenic cells of carrot expressing a mouse ornithine decarboxylase cDNA. **Plant Physiology**. 116:299–307. 1998.

ASTARITA, L.V.; FLOH, E.I.S.; HANDRO, W. Free amino acid, protein and water content changes associated with seed development in *Araucaria angustifolia*. **Biologia Plantarum**. 47:53 – 59, 2003.

BAKER, C.M; WETZSTEIN, H.Y. Influence of auxin type and concentration on peanut somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 36:361-368. 1994.

BOHINSKI, R.C.. **Bioquímica**. Addison-Wesley Iberoamericana, S. A. Wilmington, Delaware, EUA, p. 739. 1991.

BOOZ, M.R.; KERBAUY, G.B.; GUERRA, M.P.; PESCADOR, R. The role of γ -aminobutyric acid (Gaba) in somatic embryogenesis of *Acca sellowiana* Berg. (Myrtaceae). **Brazilian Journal of Plant Physiology**. 21:271-280.

BOWN, A.W.; SHELP, B.L.. The metabolism and functions of γ -aminobutyric acid. **Plant Physiology**. 115:1-5. 1997

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; STEINER, N.; SANTOS, M. ; GUERRA, M.P. Morphohistological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. **Protoplasma**. 224:33-40, 2004.

CANGAHUALA-INOCENTE, G.C; SILVEIRA, V.; CAPRESTANO, C.A.; DUCROQUET, J.P.H.J.; FLOH, E.I.S.; GUERRA, M. P.. Dynamics of biochemical and morphophysiological

changes during zygotic embryogenesis in *Acca sellowiana* (Berg.) Burr.. **Plant Growth Regulation**. 59:103-115, 2009.

CANGAHULA-INOCENTE, G.C. **Caracterização morfofisiológica, bioquímica e proteômica da embriogênese zigótica e somática de goiabeira serrana (*Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret)**. Tese. Universidade Federal de Santa Catarina. 2007.

CANHOTO, J.M.; CORREIA, S.I; MARQUES, C.I.. Factors Affecting Somatic Embryogenesis Induction and Development in *Feijoa sellowiana* Berg. **Acta horticultrae**. 839:147-155 . 2009.

CHAE, H.S.;CHO, Y.G; PARK, M.Y.; LEE,M.C.; EUN,M.Y.; KANG, B.G.; KIM, W.T..Hormonal Cross-Talk Between Auxin and Ethylene Differentially Regulates the Expression of Two Members of the 1-Aminocyclopropane-l-Carboxylate Oxidase Gene Family in Rice {*Oryza sativa* L.}. **Plant Cell Physiology**. 41(3):354-362. 2000.

CRUZ, G. L.; CANHOTO, J. M.; ABREU, M. A. V. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of *Feijoa sellowiana* Berg. **Plant Science**, 66:263-270, 1990.

CVIKROVÁ, M.; MALA, J.;EDER, J.; HRUBCOVÁ,M.; VÁGNER, M. Abscisic acid, polyamines and phenolic acids in sessil e oak somatic embryos in retation to the in conversion on potential. **Plant Physiology and Biochemistry**. 36:247-255,1998.

DE KLERK, G.J., ARNHOLDT-SCHMITT, B., LIEBEREI, R.; NEUMANN, K.H. Regeneration of roots, shoots and embryos: physiological, biochemical and molecular aspects. **Biologia Plantarum** 39:53-66. 1997.

DEDICOVÁ, B., HRICOVÁ, A., ŠAMAJ, J., OBERT, B., BOBÁK, M. ; PRET'OVÁ, A. Shoots and embryo-like structures regenerated from cultured flax (*Linum usitatissimum* L.) hypocotyl segments. **Journal of Plant Physiology**. 157:327-334. 2000.

DIAS, L.L.C.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; PIERUZZI, F.P.; FLOH, E.I.S.. Polyamines, amino acids, IAA and ABA contents during *Ocotea catharinensis* seed germination. **Seed Science and Technology**. 37:42-55, 2009.

FERREIRA, M. das G. R.; CARVALHO, C.H.S. de; CARNEIRO, A. de A.; DAMIAO FILHO, C. F.. Indução de embriogênese somática em cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.). **Revista Brasileira Fruticultura**. 27:500-503, 2005.

FINKELSTEIN, R.; REEVES, W.; ARIIZUMI, T.; STEBER, C. Molecular aspects of seed dormancy. **Annual Review Plant Biology**. 59: 387-415. 2008.

GALSTON, A.; KAUR-SAWHNEY, R.. Polyamines in Plant Physiology. **Plant Physiology**. 94:406–410. 1990.

GUERRA, M.P.; DAL VESCO, L.L. DUCROQUET, J.P.H.; NODARI, R.O.; REIS, M.S. Somatic Embryogenesis in *Feijoa sellowiana*: Genotype Response, Auxinic Shock and Synthetic Seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. 13:117-128, 2001.

HANSEN H, GROSSMANN K. Auxin-induced ethylene triggers abscisic acid biosynthesis and growth inhibition. **Plant Physiology**. 124:1437-1448. 2000.

HAVELANGE, A., LEJEUNE, P., BERNIER, G., KAUR-SAWHNEY, R., AND GALSTON, A.W. Putrescine Export in Leaves in Relation to Floral Transition in *Sinapis alba*. **Physiology. Plantarum**. 96:59–65. 1996.

JIMENEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulators**. 47:91–110, 2005.

KAEPPLER, S.M., KAEPPLER, H-F. & RHEE, Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. **Plant Molecular Biology**, 43:179-188. 2000.

KOJIMA, K. Changes of abscisic acid, indole-3-acetic acid and gibberellin-like substances in the flowers and development fruitlets of citrus cultivar 'Hyuganatsu'. **Scientia Horticulturae**. 65:263-272, 1996.

KRAFT, M.; KUGLITSCH, R.; KWIATKOWSKI, J.; FRANK, M.; GROSSMANN, K. Indole-3-acetic acid and auxin herbicides upregulate 9-cis- epoxy-carotenoid dioxygenase gene expression and abscisic acid accumulation in cleavers (*Galium aparine*): Interaction with ethylene. **Journal Exp Botany**. 58:1497–1503. 2007.

KUSANO, T.; BERBERICH, T.; TATEDA, C.; TAKAHASHI, Y. Polyamines: essential factors for growth and survival. **Planta**. v. 228, p. 367-381, 2008.

LIU C. M., XU Z. H.; CHUA N. H. Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. **Plant Cell**, v. 5, p. 621–630, 1993.

LIU J.H.; MORIGUCHI, T..Changes in free polyamines titers and expression of polyamine biosynthetic genes during growth of peach in vitro callus. **Plant Cell Reports**. 26:125–131. 2007.

LUDWIG, R.A. Arabidopsis chloroplasts dissimilate L-arginine and L-citrulline for use as N source. **Plant Physiology**, 101:429 – 434, 1993.

MINOCHA, R.; MINOCHA, S.C.; KOMAMINE, A.; SHORTLE, W.C. Role of polyamines in DNA synthesis of *Catharanthus roseus* cells grown in suspension culture. **Current topics in plant physiology**. 5:343-345. 1990.

MÖLLER, B.; WEIJERS, D.. Auxin control of embryo patterning. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology** 1: a001545. 2009.

MORDHORST, A.P.; TOONEN M.A.; DE VRIES, S.C. Plant Embryogenesis. **Critical Reviews in Plant Sciences**. 16:535-576. 1997.

MOREL, G. M; WETMORE, R. H. Fern callus tissue culture. **American Journal Botanic**. 38:141-143, 1951.

PESCADOR, R. **Aspectos Fisiológicos-Estruturais das Embriogêneses Zigótica e Somática de *Feijoa sellowiana* Berg (Myrtaceae)**. Tese, Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

PESCADOR, R.; KERBAUY, G.B.; VIVIANI, G.; KRAUS, J. E. Anomalous somatic embryos in *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Botânica**. 31:155-164, jan.-mar. 2008.

RAGHAVAN, C.; ONG, E.K.; DALLING, M.J.; STEVENSON, T.W.. Effect of herbicidal application of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in Arabidopsis. **Funct Integr Genomics** 5:4–17. 2005.

RODRIGUEZ, A. P. M.; WETZSTEIN, H. Y. A morphological and histological comparasion of the initiation and development of pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryogenesis cultures induced with naphthaleneacetic acid or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Protoplasma**, Austria: Springer-Verlag, v. 204, p. 71-83, 1998.

SALLANDROUZE, A.; FAUROBERT, M.; MAÂTAOUI, M.E. Characterization of the development stages of cypress zygotic embryos

by two-dimensional electrophoresis and by cytochemistry. **Physiology Plant**, v. 114, p. 608 – 618, 2002.

SHOEB, F.; YADAV, J.S.; BAJAJ, S.; RAJAM, M.V. Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism in different genotypes of indica rice. **Plant Sci.** v.160, p.1229-1235. 2001.

SILVEIRA, V.; BALBUENA, T.S.; SANTA-CATARINA, C.; FLOH, E.I.S.; GUERRA, M.P.; HANDRO, W. Biochemical changes during zygotic embryogenesis in *Pinus taeda* L. **Plant Growth Regulation**, v. 44, p. 147 – 156, 2004.

SLOCUM, R.D., KAUR-SAWHNEY, R., GALSTON, A.W. The physiology and biochemistry of polyamines in higher plants. **Arch. Biochem. Biophys.** v.235, p. 283-303. 1984.

STEINER, N. **Embriogênese somática em Araucaria angustifolia (Bertol.) Kuntze, Pinus sylvestris (Linneaus) e Picea abies (Linneaus) Karsten: ontogênese, padrão de expressão protéica e do gene SERK.** Universidade Federal de Santa Catarina, Tese, 163f. 2009.

STEINMACHER, D. A. ; SALDANHA, C. W. ; CLEMENT, C. R. ; GUERRA, M. P.. Cryopreservation of peach palm zygotic embryos. **Cryo-Letters**, v. 28, p. 13-22, 2007.

STEINMACHER, D.A. **Aspects of somatic embryogenesis and seed germination of peach palm.** Universidade de Hamburgo. 2010

VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHKOVA, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Important aspects of somatic embryogenesis. (Review article) **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. 69:233-249. 2002.

**CAPÍTULO 3 – O EFEITO DO FLURIDONE NA
CONVERSÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Acca sellowiana*
CULTIVADOS EM BIORREATOR DE IMERSÃO
TEMPORÁRIA RITA®**

1. Resumo

A *Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret é uma planta da família Myrtaceae nativa do Brasil. A técnica da embriogênese somática em *Acca sellowiana* está bem fundamentada, entretanto, os resultados obtidos até o presente momento têm limitado a utilização da técnica, pois os embriões somáticos obtidos apresentam uma baixa taxa de conversão em plântulas. O fluridone é um herbicida que tem como sítio de ação a inibição da fitoene desaturase, enzima catalítica da síntese de ABA. Assim, o objetivo do presente trabalho foi estudar os efeitos do Fluridone na conversão de embriões somáticos de *Acca sellowiana*. A embriogênese somática foi induzida a partir de embriões zigóticos maduros de *Acca sellowiana*. Embriões somáticos obtidos aos 120 dias foram submetidos a diferentes concentrações de fluridone em aparato de imersão temporária RITA® para a conversão em plântulas. Concentrações menores de fluridone (0-0,2 μ M) foram testadas na conversão, sendo que a concentração de 0,05 μ M resultou na conversão de 25% dos embriões em plântulas normais. Foi observado em ensaios preliminares também que embriões somáticos considerados anormais podem converter em plantas normais após a transferência para meio de cultura sem fluridone.

2.Abstract

A *Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret is a Myrtaceae species native to Brazil. Somatic embryogenesis technique in *A. sellowiana* is well established, however, the low conversion of somatic embryos limit its use. Fluridone is an herbicide which inhibits phytoene desaturase catalytic action on ABA synthesis. Therefore, this present work aims to study the effects of fluridone on *A. sellowiana* somatic embryo conversion. Somatic embryogenesis was induced from *Acca sellowiana* mature zygotic embryos. Somatic embryos were obtained on 120 days after inoculation and submitted to different fluridone concentration in RITA® systems for conversion. Low concentrations of fluridone (0-0,2 μ M) were tested for the somatic embryos conversion, and 0,05 μ M allowed 25% normal plantlet conversion. In preliminary evaluations however, some abnormal embryos also had the ability to convert into normal plants after transfer to fluridone-free medium.

3.Introdução

A embriogênese somática em *Acca sellowiana* resulta em uma elevada taxa de formação de embriões, relatada por diversos autores; entretanto os embriões somáticos obtidos apresentam uma baixa taxa de conversão em plântulas (GUERRA *et al.*, 2001; CANGAHUALA-INOCENTE *et al.*, 2007; REIS *et al.* 2008; BOOZ *et al.* 2009),). Estudos comparativos da embriogênese somática e zigótica são ferramentas essenciais para que se possa compreender a fisiologia do desenvolvimento destes e para que se possam mimetizar nos embriões somáticos os fenômenos ocorridos nos embriões zigóticos. Um postulado da embriogênese somática é que para um correto desenvolvimento dos embriões somáticos deve reproduzir ao máximo os processos fisiológicos do embrião zigótico (GUERRA *et al.*,1999).

Em *Acca sellowiana* estudos comparativos da embriogênese revelaram uma dinâmica hormonal distinta nos embriões somáticos e zigóticos. Embriões somáticos desta espécie mostraram que os níveis de ABA foram menores no estágio torpedo, seguido de um aumento progressivo até o estágio cotiledonar. Durante a embriogênese somática os teores mais elevados de ABA foram registrados no estágio torpedo, decrescendo no cotiledonar (CANGAHUALA-INOCENTE, 2007; CANGAHUALA-INOCENTE *et al.*, 2009).

Diferenças nos níveis endógenos de hormônios foram também observados para a germinação dos embriões zigóticos e a conversão dos embriões somáticos. Verificou-se que durante o início da germinação de embriões zigóticos, os níveis de AIA foram baixos e aumentaram progressivamente, entretanto na conversão dos embriões somáticos os maiores níveis foram detectados 15 dias de germinação, decrescendo posteriormente. Para o ABA os teores nos embriões zigóticos foram baixos no início da germinação, aumentando significativamente nos dias posteriores. Nos embriões somáticos, os níveis de ABA iniciaram baixos havendo um pico deste hormônio aos 10 dias de cultivos e depois diminuindo progressivamente até os 30 dias (CANGAHUALA-INOCENTE, 2007; CANGAHUALA-INOCENTE *et al.*, 2009). Estes autores atribuíram ao ABA um dos fatores para a baixa conversão dos embriões somáticos de *Acca sellowiana*, sugerindo que este pico de ABA aos 10 dias da conversão pode inibir a ação das giberelinas e da α -amilase na mobilização do amido nos embriões somáticos. Desta forma, o controle endógeno de ABA poderia ser uma estratégia eficiente para

umentar a eficiência do protocolo de conversão dos embriões somáticos desta espécie.

O fluridone é um herbicida que inibe a síntese de ABA através da inibição da fitoeno desaturase, enzima envolvida na biossíntese de carotenóides C40 a partir do qual é derivado ABA (HUNTER *et al.*, 2004). Este herbicida vem sendo utilizado com sucesso como inibidor da síntese de ABA em cultura de tecidos para reverter à dormência de tubérculos, de sementes *in vitro* e na conversão de embriões somáticos em plântulas (LE PAGE-DEGIVRY e GARELLO, 1992; SUTTLE e HULSTRAND, 1994; KEPCZYNSKA e ZIELINSKA, 2006). Assim, o uso desta substância associada a novas técnicas de cultivos, como a sistemas imersão temporária, podem ser formas de elevar o número final de plântulas de *Acca sellowiana*.

A embriogênese somática é um processo complexo no qual a sobrevivência e crescimento das plantas regeneradas são dependentes das etapas anteriores, possibilitando a conversão de embriões em plântulas. Assim apenas embriões somáticos que apresentam uma morfologia normal e que tenham acumulado substâncias de reserva suficientes e adquirido tolerância a dessecação podem vir a regenerar plântulas normais (VON ARNOLD *et al.*, 2002).

O sistema de imersão temporária envolve a imersão do explante em meio de cultivo em intervalos regulares de tempo. Este sistema vem sendo utilizado com sucesso na ampliação ou melhora de protocolos de regeneração *in vitro*, oferecendo a possibilidade de automatizar algumas fases da cultura (STEINMACHER, 2010). O sistema de imersão temporária RITA® foi desenvolvido pelo Cirad (França), inicialmente utilizado para a propagação de banana e posteriormente aplicado a diferentes espécies como *Coffea arábica*, *Citrus*, *Hevea brasiliensis* (ALVARD *et al.*, 1993; ETIENNE *et al.*, 1997, CABASSON *et al.*, 1997). O número de protocolos que utilizam este sistema para a propagação espécies vegetais aumenta continuamente (SANKAR-THOMAS *et al.*, 2008; NIEMENAK *et al.*, 2008; STEINMACHER, 2010). Em *Acca sellowiana* este sistema pode auxiliar na conversão dos embriões somáticos, automatizando esta etapa.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a conversão dos embriões somáticos de *Acca sellowiana* em resposta ao uso de biorreatores de imersão temporária e do Fluridone.

4. Material e métodos

4.1 Material vegetal

Embriões zigóticos foram obtidos a partir de frutos do cruzamento 101x458; excisados e desinfestados segundo os procedimentos descritos por Guerra *et al.* (2001). Em seguida estes explantes foram inoculados em tubos de ensaio de borosilicato com 25x150 mm contendo 20 ml do meio LPm (von ARNOLD e ERIKSSON, 1981), suplementado com vitaminas de Morel (MOREL e WETMORE, 1951), 2,4-D (20 μ M), ácido glutâmico (8 mM), maltose (3%) e ágar (0,7%). O meio de cultura teve o pH ajustado a 5,8 antes da adição do agente geleificante e o meio de cultura foi autoclavado 1,5 ATM a 121°C durante 15 minutos. As culturas foram mantidas em sala de cultura, na ausência de luz, com temperatura controlada de 25 °C \pm 2. Os embriões obtidos aos 150 dias de cultivo foram utilizados para os experimentos de conversão no presente estudo.

4.2 Efeito do Fluridone

Três experimentos foram conduzidos para avaliar o efeito de diferentes concentrações de Fluridone na conversão de embriões somáticos de *A. sellowiana*. Em todos os experimentos, os embriões foram convertidos em aparatos de imersão temporária RITA[®] contendo 200mL de meio LPm suplementado com vitaminas Morel, sacarose (30g.l⁻¹), BAP (0,5 μ M), AG₃ (1,0 μ M) e diferentes concentrações de fluridone, sendo no primeiro ensaio avaliado as concentrações de 0,1 μ M, 10 μ M e 20 μ M. O segundo experimento avaliou as concentrações de 0 μ M, 1 μ M, 5 μ M e 10 μ M de Fluridone. E por fim, o terceiro experimento avaliou concentrações menores de Fluridone (0; 0,025; 0,05; 0,2 μ M) durante a conversão de embriões somáticos. Em todos os experimentos o meio de cultura teve o pH ajustado a 5,8 antes da autoclavagem e foi autoclavado 1,5 ATM a 121°C durante 15 minutos. As culturas foram mantidas em sala de cultura, com fotoperíodo de 16 horas, com temperatura controlada de 25 °C \pm 2. O ciclo de imersão utilizado foi de 15 minutos a cada quatro horas.

Os experimentos foram arranjados em blocos completos casualizados a unidade experimental foi constituída pelo material obtido em cinco tubos de embriões somáticos. Dados de percentagem de conversão em plântulas completas (com a emissão da radícula e

cotilédones abertos), embriões anormais com formação de clorofila, embriões normais e anormais que não apresentaram clorofila, e embriões normais e anormais que apresentaram formação de antocianinas foram coletados aos 30 dias. Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de separação de médias SNK (5%). Os dados foram analisados pelo software STATISTICA® para Windows versão 7.0.

5. Resultados e discussão

5.1 Efeito do fluridone na conversão dos embriões somáticos

Protocolos repetitivos e confiáveis de embriogênese somática já foram descritos para diversas espécies, tais como coco, mandioca, cacau e pupunha (PEREZ-NUNES *et al*, 2006; GROLL *et al*, 2001; MAXIMOVA *et al*, 2002; STEINMACHER, 2010). A combinação desta rota morfogênética com os sistemas de imersão temporária aumenta a eficiência de multiplicação de diversas espécies, tais como seringueira, cacau, café e pupunha (ETIENNE *et al*, 1997; ALBARRAN *et al*, 2005.; NIEMENAK *et al*, 2008; STEINMACHER, 2010). Entretanto, não existem relatos conclusivos sobre o uso dos sistemas de imersão temporária na conversão de embriões somáticos de *Acca selowiana*. Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que a utilização do sistema de imersão temporária para conversão de embriões somáticos em *A. selowiana* é uma ferramenta eficiente e que pode reduzir os custos de produção de plântulas

Uma série de ensaios foi conduzido para avaliar o efeito de fluridone na conversão dos embriões somáticos. Em um primeiro ensaio, foram testadas diferentes concentrações mais elevadas de fluridone (0,1; 10 e 20 μM). No tratamento onde o fluridone foi suplementado em baixa concentração (0,1 μM) houve a conversão de embriões somáticos em plântulas normais (19,2%). Foram considerados convertidos aqueles embriões que formaram cotilédones, emitiram raízes e sintetizaram clorofila (Figura 16, 15 A e B). No entanto, no tratamento contendo 0,1 μM de fluridone, foi possível observar o desenvolvimento de embriões anormais, que apresentavam número de cotilédones diferente de dois, cotilédones ou eixo embrionário fusionados, mas que apresentavam a formação de clorofila (24%). Da mesma forma, foram observados fenótipos de embriões somáticos que apresentava estrutura de embriões normais, porém albinos (18,9%). Estes fenótipos são comumente encontrados na conversão de embriões somáticos de *Acca selowiana*, sendo descrito por diversos autores (GUERRA *et al.*, 2001; CANGAHUALA-INOCENTE *et al.*, 2007; CANHOTO *et al.*, 2008; REIS *et al.*, 2008).

Nos demais tratamentos (10 e 20 μM de fluridone) não foi visualizada a síntese de clorofila nos embriões somáticos. Entretanto foram observados dois outros fenótipos onde houve a formação de

antocianinas nos embriões somáticos (Figura 16C e D). Estes embriões também não convertiam em plântulas.

Um segundo experimento para se obter uma melhor compreensão das concentrações de fluridone na conversão de embriões somáticos em plântulas foi realizado. Neste experimento somente embriões submetidos a tratamentos de 0,1 μM de Fluridone converteram em plântulas completas (Figura 17a, 18), confirmando os resultados observados no ensaio anterior. Nas demais concentrações testadas, foram observados somente fenótipos onde não houve a síntese de clorofila (Figura 17b) enquanto fenótipos com a formação de antocianinas foram verificados em todos os tratamentos avaliados. As antocianinas são pigmentos de coloração vermelha, roxa e azul, pertencentes à classe dos flavonóides, produzidos pelas células epidérmicas das plantas acumulados em vacúolos colorindo os tecidos. Kim *et al.* (2006) verificou que em folhas de milho tratadas com fluridone e com suplementação de sacarose um aumento da expressão de genes ligados a biossíntese de antocianinas e maior acúmulo destas nas folhas. Desta forma, o acúmulo de antocianina em embriões somáticos de *Acca selowiana* também está possivelmente ligado a combinação de sacarose e fluridone no meio de cultura.

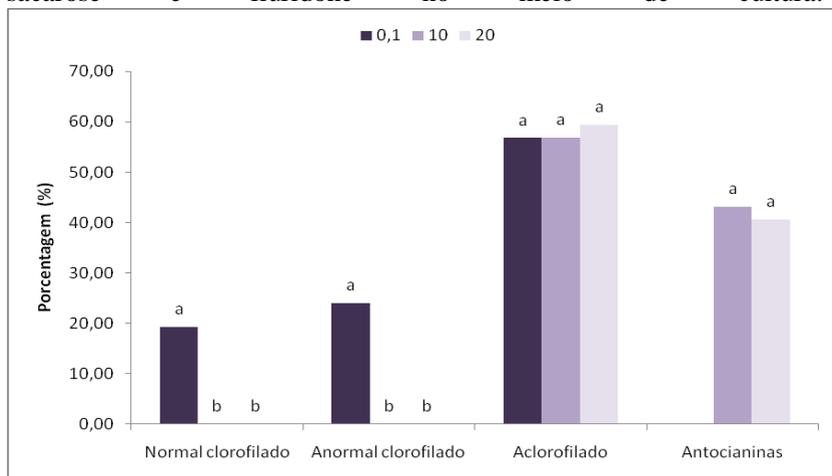


Figura 15) Distribuição dos fenótipos observados na conversão de embriões somáticos de *Acca selowiana* aos trinta dias de cultivo, submetidos a diferentes concentrações de Fluridone (0,1; 10 ou 20 μM). Letras diferentes na série diferem segundo o teste SNK 5%. CV= Normal clorofilado 110,4%; Anormal clorofilado 110,1%; Aclorofilado 3,6%; Antocianinas 20,2%. Dados transformados em $\text{Raiz}(x+0,5)$.

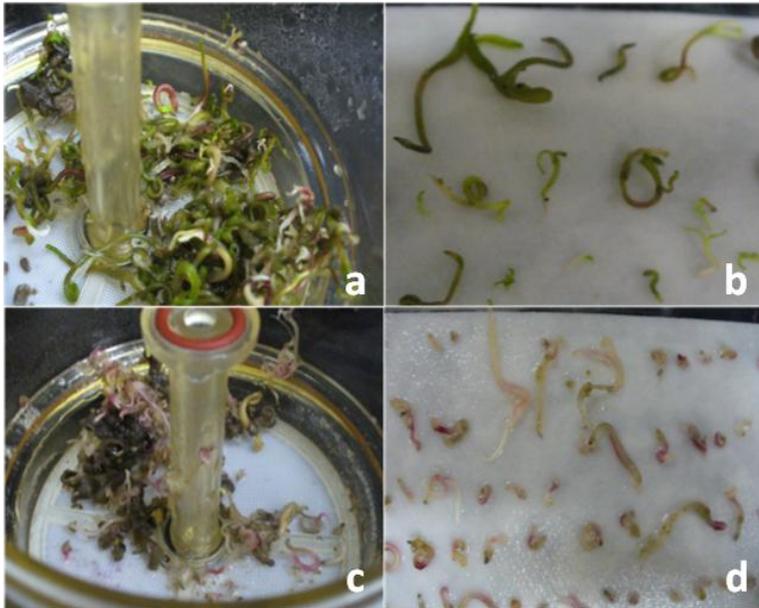


Figura 16) Plântulas de *Acca sellowiana* convertidas em bioreator de imersão temporária RITA®: a) plântulas convertidas em meio suplementado com; b) plântulas obtidas em resposta ao fluridone 0,1 μ M c) plântulas convertidas em meio suplementado com fluridone 20 μ M; d) aspecto das plântulas obtidas em resposta ao fluridone 0,1 μ M

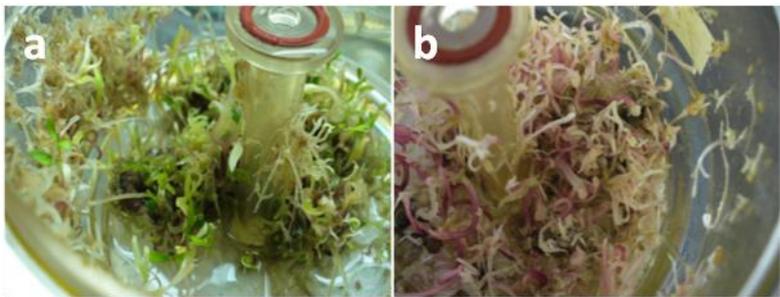


Figura 17) Plântulas de *Acca sellowiana* convertidas em bioreator de imersão temporária RITA®: a) Plântulas convertidas em meio suplementado com fluridone 0,1 μ M; b) Plântulas convertidas em meio suplementado com fluridone 5 μ M. Notar a ausência de clorofila nas plântulas.

Durante a conversão dos embriões somáticos em plântulas foi observado que em algumas plântulas o cotilédone não apresentou síntese de clorofila, mas os seguintes pares de folhas eram clorofilados. Em tubérculos de inhame a utilização de fluridone (30 mM) causou branqueamento de folhas e caules pelo acúmulo de fitoeno ao invés de clorofila, no entanto cerca de 150 dias após o tratamento com fluridone estes efeitos foram amenizados, sendo que os nós superiores iniciaram o acúmulo de clorofila (HEMADINA *et al.*, 2010). Similarmente, trabalhos com cevada demonstraram que a ação do fluridone se dá na inibição da síntese de carotenóides e que este não afeta a biogênese dos plastídios nem sua composição protéica (GAMBLE e MULLET, 1986), de forma que após a remoção do fluridone, os plastídios podem sintetizar clorofila.

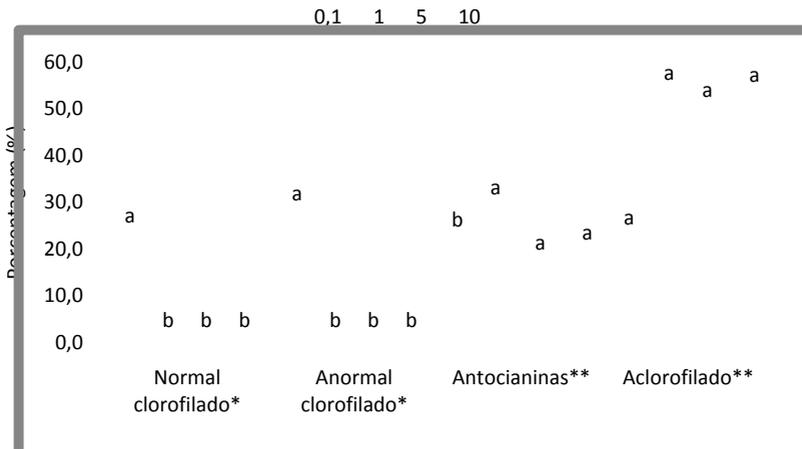


Figura 18) Distribuição dos fenótipos observados na conversão de embriões somáticos de *Acca sellowiana* aos trinta dias de cultivo, submetidos a diferentes concentrações de Fluridone (0,1; 1,0; 5,0 ou 10 µM). Letras diferentes na série diferem segundo o teste SNK 5%. * Dados transformados em Raiz(x+0,5) **Dados transformados em Log(x + 1). CV= Normal clorofilado 115,1; Anormal clorofilado 117,4; Carotenóides 17,4%; Branco 12,3%.

Como altas concentrações de fluridone inibiram a clorofila nos embriões somáticos convertidos de *Acca sellowiana* foram testadas menores concentrações deste inibidor da síntese de ABA. Em concentrações variando de 0 a 0,2µM de fluridone foi possível observar

o fenótipo normal clorofilado em todas as concentrações testadas. A melhor concentração encontrada foi a de 0,05 μM de fluridone que proporcionou 25% de conversão dos embriões somáticos em plântulas (Figura 19), porém sem diferenças significativas em relação aos outros tratamentos. Em *Acca sellowiana* resultados anteriores demonstraram que a conversão dos embriões em plântulas foi ainda mais baixa, variando entre 2 e 15% (CANGAHUALA-INOCENTE *et al.*, 2007; GUERRA *et al.*, 2001; CANHOTO *et al.*, 2008; REIS *et al.*, 2008). Müller (2008) utilizando fluridone (0-10 μM) em meio estacionário obteve melhores taxas de conversão utilizando 1 μM deste inibidor, conseguindo uma taxa de conversão de 9,37%. Neste estudo, altas concentrações de fluridone impediram a conversão dos embriões somáticos em plântulas, resultando em embriões de coloração branca, similar aos resultados obtidos no presente estudo. Desta forma, outras estratégias ainda precisam ser empregadas para aumentar a capacidade de conversão dos embriões somáticos, possivelmente associando o uso do pulso de 2,4-D com o uso de imersão temporária com meio de cultura enriquecido com fluridone em baixas concentrações.

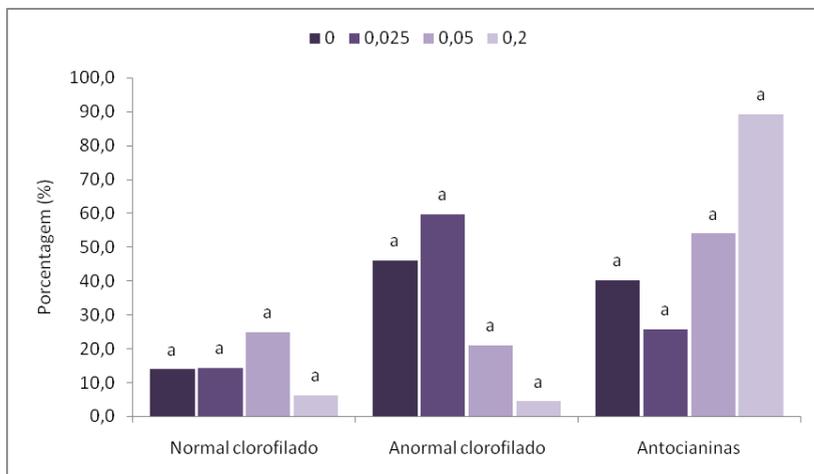


Figura 19) Distribuição dos fenótipos observados na conversão de embriões somáticos de *Acca sellowiana* aos trinta dias de cultivo, submetidos a diferentes concentrações de Fluridone (0; 0,025; 0,05 ou 0,2 μM). Dados transformados em Raiz(x+0,5). CV= Normal clorofilado 28,5%; Anormal clorofilado 36,8%; Antocianinas 22,1%. Letras diferentes na série diferem segundo o teste SNK 5%.

Para testar a capacidade de conversão em plântulas, embriões somáticos considerados anormais algumas foram repicadas para tubos de ensaio com meio de cultivo livre de fluridone. Após 15 dias foi verificado que embriões somáticos consideradas anteriormente anormais tiveram um desenvolvimento normal (Figura 21). Embriões somáticos que continham três cotilédones desenvolveram-se em plântulas normais a partir do segundo ou terceiro par de folhas (Figura 21A e B). Nos embriões fusionados alguns tiveram seu desenvolvimento normal e puderam ser separados dos demais (Figura 21C). Foram observados também fenótipos onde o cotilédone se apresentava bipartido, sendo que o desenvolvimento dos novos pares de folhas o primeiro foi alterno e os seguintes normais (opostos) para *Acca sellowiana* (Figura 21D). Trabalhos com amendoim têm relatado que os embriões considerados anormais podem recuperar suas características normais quando transferidos para meios isentos de fitorreguladores (CHENGALRAYAN *et al.*, 1997, 2001). Isto indica uma regulação transitória no desenvolvimento anormal do embrião somático, que ao transferir para condições mais próximas do ideal, estes retomam o crescimento normal. Um dos possíveis mecanismos controlando este aspecto poderia ser atribuído às alterações epigenéticas, devido às condições de cultivo impostas pelo ambiente *in vitro*.

Assim, na conversão de embriões somáticos de *Acca sellowiana* a utilização de baixas concentrações de fluridone, se mostrou eficiente na melhora das taxas de conversão de embriões somáticos em plântulas. Ao contrário altas taxas deste (acima de 0,2 μ M) resultaram num branqueamento dos embriões somáticos.

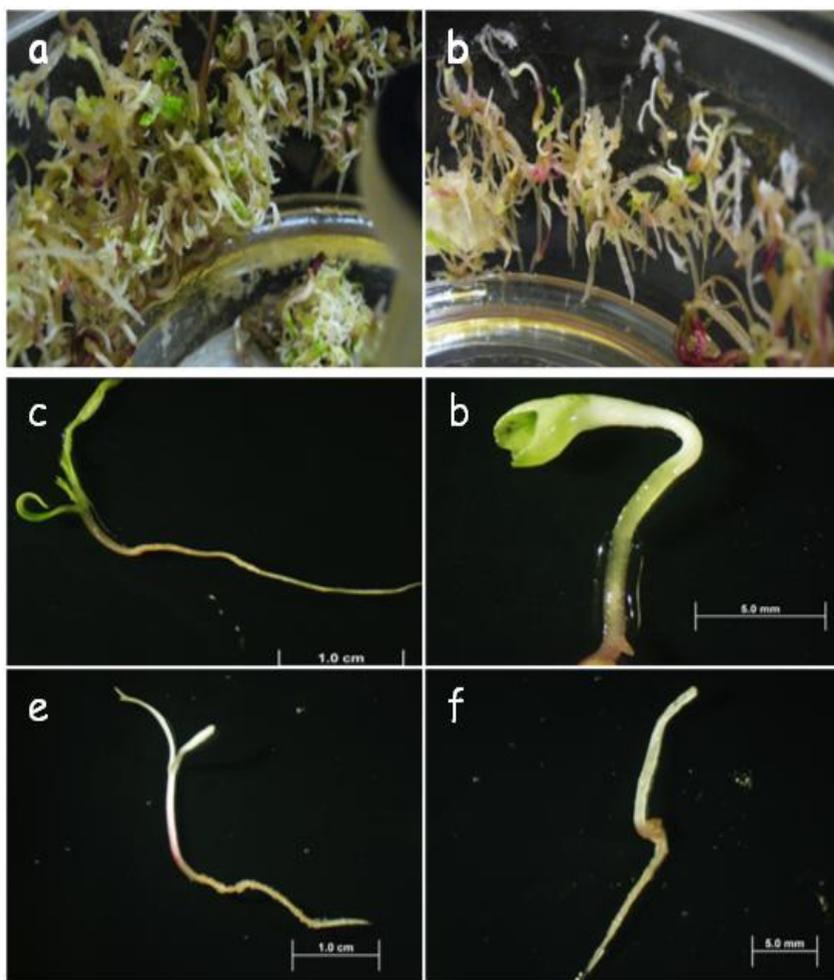


Figura 20) Conversão de embriões somáticos de *Acca sellowiana* em bioreator de imersão temporária RITA®: a) Embriões convertidos em meio suplementado com fluridone 0,025 μ M; b) Embriões convertidos em meio suplementado com fluridone 0,2 μ M; c) Plântula normal; d) plântula anormal com cotilédones fusionados, onde houve a formação de clorofila; e) Plântula normal onde não houve a formação de clorofila, somente de antocianinas; f) Plântula anormal com um único cotilédone onde não houve a formação de clorofila, somente de antocianina.

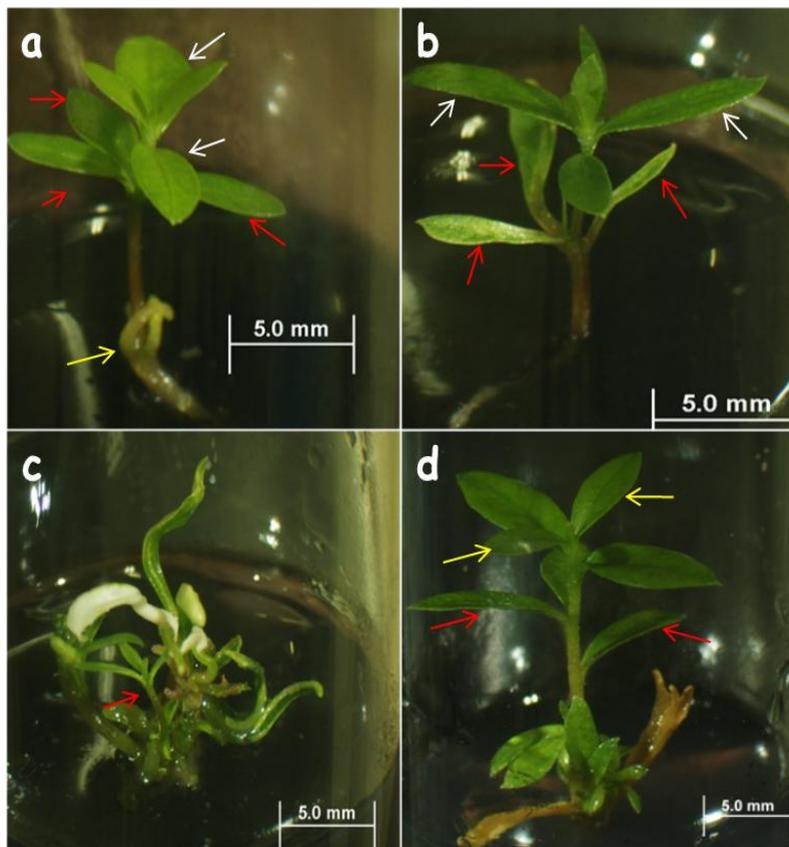


Figura 21) Plântulas de *Acca sellowiana* obtidas a partir de embriões anormais aos 15 dias de subcultivo: a) Plântula obtida de embrião tri cotiledonar, seta amarela indica os cotilédones, vermelha oprime o trio de folhas e brancas o terceiro par de folhas; b) Plântula obtida de embrião tri cotiledonar, seta vermelha indica os cotilédones e brancas o primeiro par de folhas; c) Plântulas obtidas de embriões fusionados a seta indica o desenvolvimento de plântulas normais; d) Plântula obtida de embriões com cotilédones bipartidos, setas vermelhas indicam folhas alternas e setas amarelas o seguinte par de folhas opostas.

6.Referências bibliográficas

ALBARRAN J, BERTRAND B, LARTAUD M, ETIENNE H Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos. . **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. 81: 27-36. 2005.

Alvard, D.; Cote, F.; Teisson, C. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. **Plant Cell Plant Cell Tissue and Organ Culture**. 32:55-60. 1993.

BOOZ, M.R.; KERBAUY, G.B.; GUERRA, M.P.; PESCADOR, R. The role of γ -aminobutyric acid (Gaba) in somatic embryogenesis of *Acca sellowiana* Berg. (Myrtaceae). **Brazilian Journal Plant Physiology**. 21:4:271-280. 2008.

CABASSON, C.; ALVARD, D.; DAMBIER, D.; OLLITRAULT, P.; TEISSON, C. Improvement of Citrus somatic embryo development by temporary immersion. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. 50:33-37, 1997

CANGAHULA-INOCENTE, G.C.; DAL VESCO, L.L.; STEINMACHER, D.A., TORRES, A.C.; GUERRA, M.P. Improvements in somatic embryogenesis protocol in Feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Burret): Induction, conversion and synthetic seeds. **Scientia Horticulturae**. 11:228–234, 2007

CANGAHUALA-INOCENTE, G.C; SILVEIRA, V.; CAPRESTANO, C.A.; DUCROQUET, J.P.H.J.; FLOH, E.I.S.; GUERRA, M. P.. Dynamics of biochemical and morphophysiological changes during zygotic embryogenesis in *Acca sellowiana* (Berg.) Burr.. **Plant Growth Regulation**. 59:103-115, 2009.

CANGAHULA-INOCENTE, G.C. **Caracterização morfofisiológica, bioquímica e proteômica da embriogênese zigótica e somática de goiabeira serrana (*Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret)**. Tese. Universidade Federal de Santa Catarina. 2007.

CANHOTO, J.M.; CORREIA, S.I; MARQUES, C.I. Factors Affecting Somatic Embryogenesis Induction and Development in *Feijoa sellowiana* Berg. **Acta Horticulturae**. 839:147-155 . 2009.

CHENGALRAYAN, K.; HAZRA, S.; GALLO-MEAGHER, M.. Histological analysis of somatic embryogenesis and organogenesis

induced from mature zygotic embryoderived leaflets of peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant Science**. 161:415–421.2001.

CHENGALRAYAN, K.; MHASKE, V.B.; HAZRA, S.. High frequency conversion of abnormal peanut somatic embryos. **Plant Cell Reports**. 16:783–786. 1997.

ETIENNE, H.; LARTAUD, M.; MICHAUX-FERRIÈRE, N.; CARRON, M.; BERTHOULY, M.; TEISSON, C.; Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.) using the temporary immersion technique. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**. 33: 81-87. 1997.

GAMBLE, P.E.; MULLET, J.E. Inhibition of carotenoid accumulation and abscisic acid biosynthesis in fluridone-treated dark-grown barley. **European Journal of Biochemistry**. 160, 117- 121. 1986.

GROLL, J.; MYCOCK, D.J.; GRAY, V.M.; LAMINSKI, S.. Secondary somatic embryogenesis of cassava on picloram supplemented media. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. 65: 201-210. 2001.

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.

GUERRA, M.P.; DAL VESCO, L.L. DUCROQUET, J.P.H.; NODARI, R.O.; REIS, M.S. Somatic Embryogenesis in Feijoa sellowiana: Genotype Response, Auxinic Shock and Synthetic Seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. 13:117-128. 2001.

HAMADINA, E.I.; CRAUFURD, P.Q.;BATTEY, N.H.; ASIEDU, R.. In vitro micro-tuber initiation and dormancy in yam. **Annals of Applied Biology**. 157:203–212. 2010.

HUNTER, D.A.; FERRANTE, A.; VERNIERI, P.; REID,M.S.. Role of abscisic acid in perianth senescence of daffodil (*Narcissus pseud narcissus* “Dutch Master”). **Physiologia Plantarum**. 121: I.2:313–321. 2004.

KEPCZYNSKA, E.; ZIELINSKA, S. Regulation of *Medicago sativa* L. somatic embryos regeneration by gibberellin A3 and abscisic acid in relation to starch content and α -amylase activity. **Plant Growth Regulation**. 49:209-217. 2006.

KIM, J.S.; LEE, B.H.; KIM, S.H.; OH, K.H; YUN, CHO K. Response to environmental and chemical signals for anthocyanin biosynthesis in nonchlorophyllous corn (*Zea mays* L.) leaf. **Journal of Plant Biology**. 49: 16–25. 2006.

LE PAGE-DEGIVRY, M.T.; GARELLO, G.. In situ abscisic acid synthesis. A requirement for induction of embryo dormancy in *Helianthus annuus*. **Plant Physiology**. 98:1386–1390.1992.

MAXIMOVA SN, ALEMANNO L, YOUNG A, FERRIERE N, TRAORE A, GUILTINAN MJ. Efficiency, genotypic variability, and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. 38: 252-259.2002.

MOREL, G. M; WETMORE, R. H. Fern callus tissue culture. **American Journal Botanic**. 38:141-143, 1951.

MÜLLER, T. S. **Fisiologia e Metabolismo da Embriogênese somática e zigótica de *Acca sellowiana* (Berg) Burret (Myrtaceae)**. Dissertação. Universidade Federal de Santa Catarina, p. 92. 2008.

MULWA, R.M.S.; MWANZA, L.M. Biotechnology approaches to developing herbicide tolerance/selectivity in crops. **African Journal of Biotechnology**. 5:396-404 .2006.

NIEMENAK, N.; SAARE-SURMINSKI, K.; ROHSIUS, C.; NDOUMOU, D.O.; LIEBEREI, R.. Regeneration of somatic embryos in *Theobroma cacao* L. in temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues. **Plant Cell Reports**. 27: 667-676. 2008.

PEREZ-NUNEZ, M.T.; SOUZA, R.; SAENZ, L.; CHAN, J.L.; ZUNIGA-AGUILAR, J.J.; OROPEZA, C.. Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) plumule explant. **In vitro cellular & developmental biology**. 42:37-43. 2006.

POPOVA, L. Fluridone- and light-affected chloroplast ultrastructure and ABA accumulation in drought-stressed barley. **Plant Physiology and Biochemistry**. 36,4: 313-3 19. 1998.

PURI, A.; MACDONALD, G. E.; HALLER, W. T.; Singh, M. Phytoene and β -carotene response of fluridone-susceptible and -resistant hydrilla (*Hydrilla verticillata*) biotypes to fluridone . **Weed Science**. 54: 995-999. 2006

REIS, E.; BATISTA, MT.; CANHOTO, JM. Effect and analysis of phenolic compounds during somatic embryogenesis induction in *Feijoa sellowiana* Berg. **Protoplasma**. 232:193–202. 2008.

SANKAR-THOMAS, Y.D.; SAARE-SURMINSKI, K.; LIEBEREI, R. Plant regeneration via somatic embryogenesis of *Camptotheca acuminata* in temporary immersion system (TIS). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. 95: 163-173. 2008.

STEINMACHER, D.A. **Aspects of somatic embryogenesis and seed germination of peach palm**. Universidade de Hamburgo. 2010

SUTTLE, J.C.; HULTSTRAND, J.F. Role of endogenous abscisic acid in potato microtuber dormancy. **Plant Physiology**. 105:891–896. 1994.

VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHKOVA, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Important aspects of somatic embryogenesis. (Review article) **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. 69:233-249. 2002.

VON ARNOLD, S.; ERIKSSON, T. A. In vitro studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. **Canadian Journal of Botany**. 59:870-874. 1981.

Conclusões e perspectivas futuras

Neste trabalho informações relevantes sobre a embriogênese somática em *Acca sellowiana* foram obtidas. Estas informações poderão servir de base para a propagação massal desta espécie e servir como modelo para espécies lenhosas.

O 2,4-D é essencial na indução da embriogênese somática em *Acca sellowiana*, sendo que o pré-tratamento dos embriões zigóticos na indução da embriogênese somática se mostrou eficiente. A resposta na formação de embriões globulares pelo pré-tratamento com 2,4-D foi 15 dias mais rápida do que na suplementação deste no meio de cultivo, entretanto a formação de embriões foi três vezes maior quando da suplementação. A conversão de embriões somáticos em plântulas foi mais eficiente quando do pré tratamento com 2,4-D, resultando num percentual mais alto de plântulas convertidas e numa menor taxa de embriões anormais.

Esta taxa mais elevada de conversão dos embriões somáticos em plântulas em resposta ao pré-tratamento com 2,4-D pode estar associada a uma alteração completa nos processos metabólicos dos embriões, como maior acúmulo de AIA, menor quantidade de ABA endógeno e uma maior concentração de poliaminas.

A utilização de baixas concentrações de fluridone, um herbicida inibidor da síntese de ABA, se mostrou eficiente na melhora das taxas de conversão de embriões somáticos em plântulas. Ao contrário altas taxas deste (acima de 0,2 μ M) resultaram num branqueamento dos embriões somáticos. Foi observado também que embriões considerados anormais resultaram em plantas normais após a transferência para meio de cultura com ausência de fluridone.

A melhora das taxas de conversão dos embriões somáticos de *Acca sellowiana* em plântulas pode ser consequência da ocorrência de distúrbios fisiológicos e/ou genéticos protagonizados pela indução com o 2,4-D. Aplicações de butionina sulfoximina (BSO), um inibidor da glutatona redutase, que altera o pool de glutatona celular para a forma oxidada GSSG têm sido utilizadas para minimizar este problema. Isto parece afetar positivamente a qualidade do embrião por meio de melhorias na estrutura do meristema apical e na promoção da maturação do embrião somático. Assim sugere-se testar a adição de BSO ou glutatona oxidada, tornando o meio de maturação oxidado, na influência na qualidade do embrião somático.

Assim, propomos um novo protocolo para a indução da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos em *Acca*

sellowiana (Figura 22). As inovações neste protocolo estão na substituição da suplementação de 2,4-D no meio de cultivo pelo pré-tratamento destes com 200 μ M de 2,4-D por 60 minutos. O outro está em diminuir a mão-de-obra ao se individualizar os embriões somáticos para convertê-los em plântulas. A utilização do sistema de imersão temporária RITA em conjunto com o inibidor da síntese de ABA diminui gastos de mão-de-obra com repicagens e em 30 dias os embriões já estão prontos para a aclimatização via semente sintética.

Outro ponto que necessita de avanços no protocolo de embriogênese somática é a questão do explante inicial. A utilização de embriões zigóticos como explantes limita o uso da técnica em larga escala por não possibilitar a fixação dos ganhos genéticos. Uma alternativa a isto é a utilização de explantes provenientes de planta adultas na indução. Trabalhos anteriores relatam que a indução a partir de explantes florais e foliares foi possível, entretanto foi obtido um número limitado de embriões somáticos. Trabalhos com ênfase neste ponto são necessários como também trabalhos com a embriogênese repetitiva que poderia solucionar o problema de baixa formação de embriões.

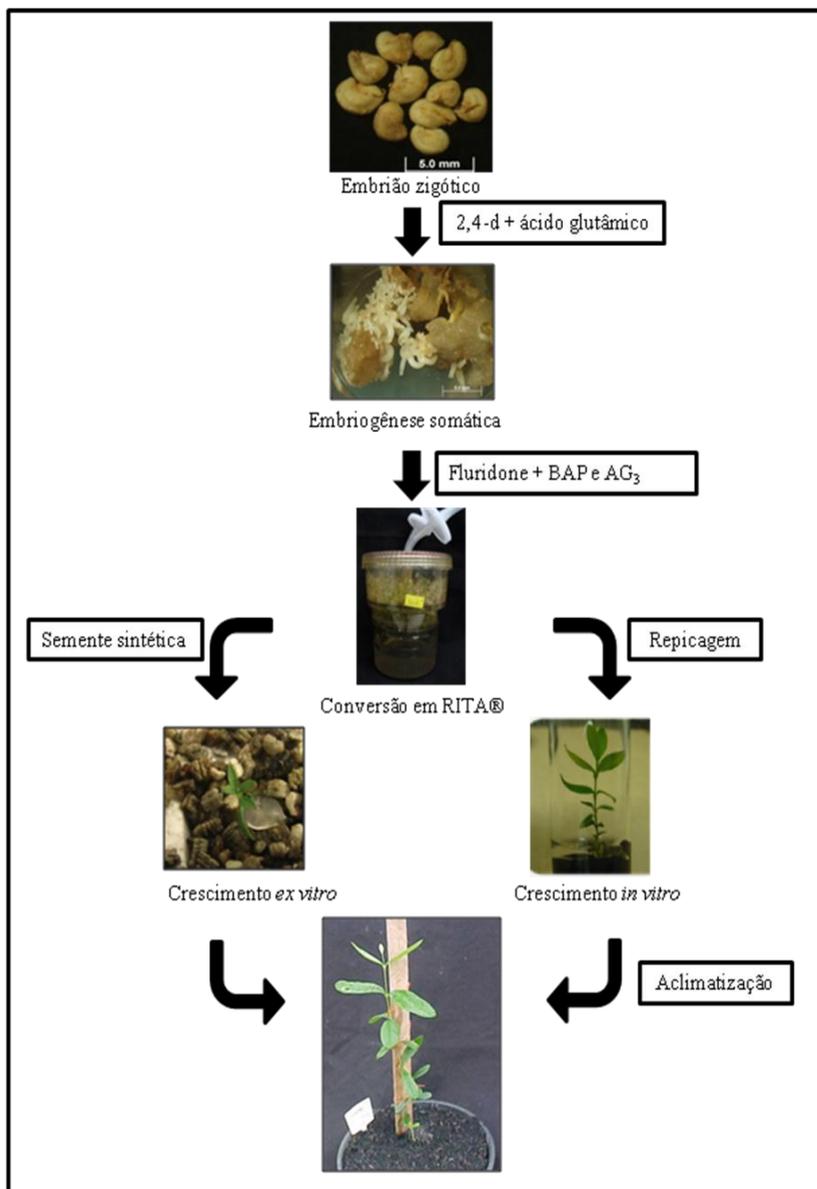


Figura 22) Protocolo proposto para a embriogênese somática de *Acca sellowiana*.