



DIOGO PEDROSA CORRÊA DA SILVA

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E POTENCIAL
USO DE MARCADORES MOLECULARES
EMBRIOGÊNICOS EM *Byrsonima intermedia* A.
Juss. (MURICI-PEQUENO)**

LAVRAS – MG

2012

DIOGO PEDROSA CORRÊA DA SILVA

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E POTENCIAL USO DE
MARCADORES MOLECULARES EMBRIOGÊNICOS EM *Byrsonima
intermedia* A. Juss. (MURICI-PEQUENO)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de "Doutor".

Orientador

Prof. Renato Paiva, Ph.D.

Coorientadores

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva,

Prof^a. Dr^a. Raírys Cravo Herreira

**Lavras – MG
2010**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Silva, Diogo Pedrosa Corrêa da.

Embriogênese somática e potencial uso de marcadores moleculares embriogênicos em *Byrsonima intermedia* A. Juss. (murici-pequeno) / Diogo Pedrosa Corrêa da Silva. – Lavras : UFLA, 2012.

125 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Renato Paiva.

Bibliografia.

1. Calogênese. 2. Embriões somáticos. 3. Hiper-hidricidade. 4. Primers degenerados. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 581.87328

DIOGO PEDROSA CORRÊA DA SILVA

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E POTENCIAL USO DE
MARCADORES MOLECULARES EMBRIOGÊNICOS EM *Byrsonima
intermedia* A. Juss. (MURICI-PEQUENO)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em 19 de outubro de 2010.

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva	UFLA
Prof. Dr. Breno Regis Santos	UNIFAL
Prof ^ª . Dr ^ª . Fernanda Carlota Nery	UFSJ
Dr. Marcelo Murad Magalhães	UFLA

Prof. Renato Paiva, Ph.D.
UFLA
(Orientador)

**LAVRAS – MG
2010**

A Deus,

Que não dá a você o desejo de fazer o que você não tem capacidade para fazer.

OFEREÇO

À minha família,

Que um dia acreditou em mim.

E a minha querida mãe,

Que um dia resolveu levar a vida pelos filhos.

Obrigado por me transformar em quem sou hoje.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudo e apoio financeiro.

Ao meu orientador, professor Renato Paiva, pelo aprendizado, amizade e incentivo durante o curso.

Aos meus coorientadores prof. Luciano Vilela Paiva e Rairys Cravo Nogueira pela atenção, conselhos, recomendações, amizade e profissionalismo.

Aos demais membros da banca examinadora: prof. Luciano Vilela Paiva, prof. Breno Regis Santos, prof^a. Fernanda Carlota Nery, Dr. Marcelo Murad Magalhães, Dra. Daiane Peixoto Vargas e Dra. Milene Alves de Figueiredo Carvalho.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, do setor de Fisiologia Vegetal, de hoje e de ontem, pela colaboração e amizade.

Aos novos amigos do Laboratório Central de Biologia Molecular, pela ajuda no momento novo e principalmente ao Andersom, por toda atenção e ajuda.

Aos amigos da Fisiologia Vegetal, e a todos os funcionários, pela amizade e ajuda nesses 7 anos de Fisiologia Vegetal.

À Grande pequena Família Pedrosa, Vó Tuxa e Vô Newton (in memoriam), minhas tias, Vera, Lúcia e Mirian (in memoriam) e meus tios Marcelo e Rodrigo (in memoriam), meus irmãos Mô, Guto e Gaby (Pinduquinha), minha pequena, Sophia (Creuzinha), meu afilhado delícia Matheus (Beijudinho), e agregados, “tia” Laura, meu padraсто Sérgio (Chuchu),

e aos outros membros da família e parentes pela torcida, amor e dedicação, sem vocês não seria nada.

Aos meus pais, Renato (in Memoriam), e minha mãe, Guerreira, meu mundo, meu ponto de equilíbrio e de apoio, Maria Lúcia, por minha vida inteira.

Aos amigos irmãos da cachorrada, salve, salve cachorrada, pela amizade fraternal e pelas cervejinhas.

Às grandes amizades feitas durante essa vida acadêmica, Marcelinho, Bola, Humberto, Fran, Fúlvia, João Paulo, pela amizade incondicional, pelo carinho fraterno e por toda a ajuda.

A todos os amigos, antigos e novos, pela convivência, apoio e grande amizade durante toda a minha vida.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma, para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Diogo Pedrosa Corrêa da Silva, filho de Renato Lopes Corrêa da Silva e Maria Lúcia Pedrosa Corrêa da Silva, nasceu em 12 de março de 1981, na cidade de São João Del-Rei, estado de Minas Gerais.

Concluiu o ensino médio na Escola Estadual Cônego Oswaldo Lustosa, em dezembro de 1998, na cidade de São João Del-Rei.

Graduou-se Engenheiro Agrônomo pela Universidade Federal de Lavras em julho de 2005. Durante o curso de graduação foi bolsista de iniciação científica pela FAPEMIG, sob a orientação do professor Renato Paiva, no período de julho de 2003 a julho de 2005, na área de Fisiologia Vegetal, desenvolvendo vários trabalhos em propagação *in vitro* de plantas.

Ingressou no mestrado em Agronomia, área de concentração Fisiologia Vegetal, em agosto de 2005, concluindo-o em agosto de 2007, sob a orientação da professora Patrícia Duarte de Oliveira Paiva.

Em agosto de 2007, iniciou o doutorado em Fisiologia Vegetal da UFLA, e em outubro de 2010, encerra esta etapa profissional com a presente tese.

RESUMO

A *Byrsonima intermedia* A. Juss., espécie do cerrado, é comumente conhecida por murici-pequeno, devido ao seu pequeno porte em comparação a outras espécies do gênero. É considerada uma espécie com grande potencial medicinal já com alguns trabalhos científicos comprobatórios, que apresenta grande dificuldade de propagação natural por apresentar baixa germinação, crescimento lento e dormência tegumentar. Neste contexto, técnicas de cultura de tecidos apresentam-se como alternativa a propagação sexuada, destacando-se o uso da embriogênese somática. Assim, objetivou-se neste estudo determinar um protocolo a e avaliar aspectos da expressão gênica associada ao processo de indução de embriogênese somática de murici-pequeno. Para a indução de calos a partir de folhas de plântulas germinadas *in vitro*, foram testados diferentes subcultivos (60 dias) e concentrações de diferentes citocininas (BAP, TDZ, ZEA e CIN) combinados com concentrações de ANA. Diferentes concentrações de ANA também foram avaliadas na indução de calos pró-embriogênicos. Para a indução de calos embriogênicos e embriões somáticos, os calos pró-embriogênicos foram subcultivados em meio MS sem a adição de reguladores de crescimento. Os embriões somáticos originados foram inoculados em meio de maturação contendo diferentes concentrações de GA₃ e de ABA. A formação de embriões secundários, o controle da hiper-hidricidade, o efeito de diferentes concentrações de sacarose e meios de cultura, diferentes vedações e concentrações de ágar também foram avaliadas. As análises moleculares foram realizadas em diferentes explantes (calos pró-embriogênicos e embriogênicos e embriões somáticos). Os resultados mostram que para a indução de embriões somáticos, o uso de cinetina juntamente com ANA apresentou formação de embriões somáticos no segundo (4,76 µM de CIN + 0,54 µM de ANA) e terceiro (5,17 µM de CIN + 10,54 µM de ANA) subcultivos. O uso de alta concentração de ANA (537,06 µM) favoreceu a formação de embriões somáticos. O uso de GA₃ na concentração de 28,87 µM favoreceu a formação de plântulas. O uso de tampas sem PVC e tampa comercial Biosama® apresentaram melhores resultados para tubos de ensaio e para frascos, respectivamente. O meio de cultura WPM suplementado com 3% de sacarose e solidificado com 0,8% de ágar reduziu a hiper-hidricidade de embriões somáticos. Mesmo sendo observado amplificação de fragmentos para os genes *AGLI*, *LECI*, *SERK* e *BBM*, não foi possível realizar a RT-qPCR devido a dificuldade de realizar o sequenciamento dos genes em virtude de tratar-se de planta nativa.

Palavras-chave: *Byrsonima intermedia*, Calogênese, Embriões somáticos, Hiper-hidricidade, *Primers* degenerados.

ABSTRACT

Byrsonima intermedia A. Juss., a Brazilian vegetation species, is commonly known as 'murici-pequeno', due to its small size compared to similar species. Evidence from previous studies shows the plant has great medicinal potential; though the plant has great difficulty in propagating naturally, due to its low germination, slow growth and tegumental dormancy. In this context, tissue culture techniques are presented as an alternative to sexual propagation, the use of somatic embryogenesis being of particular interest. Therefore, this study aimed to establish a protocol for, and analyze aspects of, the gene expression associated with the process of inducing somatic embryogenesis in murici-pequeno. For the induction of calluses from seedling leaves *in vitro*, different subcultures were tested (60 days) and concentrations of different cytokinins (BAP, TDZ, KIN and ZEA) combined with concentrations of NAA. Different concentrations of NAA were also analyzed in the induction of pro-embryogenic calluses. For the induction of embryogenic calli and somatic embryos, the pro-embryogenic calli were subcultured on MS area without adding growth regulators. The somatic embryos were inoculated in a maturation medium containing different concentrations of GA₃ and ABA. The formation of secondary embryos, the control of hyperhydricity, the effect of different sucrose concentrations and culture media, different agar seals and concentrations were also analyzed. Molecular analyses were performed on different explants (pro-embryogenic and embryogenic calluses and somatic embryos). The results show that for the induction of somatic embryos, the use of kinetin with NAA presented the formation of somatic embryos in the second (4.76 µM CIN + 0.54 µM NAA) and third (5.17 µM CIN + 10.54 µM NAA) subcultures. The use of high concentrations of NAA (537.06 µM) favored the formation of somatic embryos. The use of GA₃ in the concentration of 28.87 µM favored the formation of seedlings. The use of caps without PVC and Biosama[®] caps presented better results for test tubes and vials, respectively. The WPM medium, supplemented with 3% of sucrose and solidified with 0.8% of agar, reduced the hyperhydricity of somatic embryos. Even by observing the amplified fragments of genes *AGLI*, *LECI*, *SERK* and *BBM*, it was not possible to perform the RT-qPCR because of difficulties in carrying out gene sequencing; this due to murici-pequeno being a native plant.

Keywords: *Byrsonima intermedia*, callus formation, somatic embryos, Hyperhydricity, degenerate primers.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Embriogênese somática e potencial uso de marcadores moleculares embriogênicos de <i>Byrsonima intermedia</i> A. Juss. (murici-pequeno).....	1
1	INTRODUÇÃO.....	2
2	REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1	Descrição botânica e propriedades medicinais da espécie	4
2.2	Cultivo <i>in vitro</i> e cultura de calos	6
2.3	Embriogênese somática	10
2.5	Análises moleculares.....	14
	REFERÊNCIAS.....	18
	CAPÍTULO 2 Embriogênese somática <i>in vitro</i> de murici-pequeno	28
1	INTRODUÇÃO.....	31
2	MATERIAL E MÉTODOS	33
2.1.1	Germinação <i>in vitro</i>	33
2.1.2	Obtenção de calos.....	34
2.2	Indução de calos pró-embriogênicos	34
2.2.1	Fontes e concentrações de citocininas e ANA.....	34
2.2.2	Efeito de altas concentrações de ANA.....	35
2.3	Indução de calos embriogênicos e embriões somáticos.....	35
2.4	Maturação de embriões somáticos	36
2.4.1	Efeito do ácido giberélico (GA₃)	36
2.4.2	Efeito do ácido abscísico (ABA).....	37
2.5	Indução de embriões somáticos secundários	37
2.6	Controle da hiper-hidricidade na embriogênese somática de murici-pequeno	38
2.6.1	Uso de diferentes concentrações de sacarose e meios de cultura	38
2.6.2	Tipos de vedação para tubo de ensaio e concentrações de ágar na maturação <i>in vitro</i> de embriões somáticos.....	38
2.6.3	Tipos de tampas para frascos e concentrações de ágar na maturação <i>in vitro</i> de embriões somáticos.....	40
2.7	Análise estatística	41
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
3.1	Indução de calos pró-embriogênicos.....	42
3.1.1	Fontes e concentrações de citocininas e ANA e altas concentrações de ANA.....	42
3.2	Indução de calos embriogênicos e embriões somáticos.....	43
3.2.1	Influência de fontes e concentrações de citocininas e ANA.....	43

3.2.2	Efeito de altas concentrações de ANA na indução de embriões somáticos.....	51
3.3	Maturação de embriões somáticos	53
3.3.1	Efeito do ácido giberélico (GA ₃)	54
3.3.2	Efeito do ácido abscísico (ABA).....	59
3.3.3	Indução de embriões somáticos secundários	63
3.4	Controle da hiper-hidricidade na embriogênese somática de murici-pequeno	67
3.4.1	Uso de diferentes concentrações de sacarose e meios de cultura	67
3.4.2	Tipos de vedação para tubos de ensaio e concentrações de ágar na maturação <i>in vitro</i> de embriões somáticos	72
3.4.3	Tipos de tampas para frascos e concentrações de ágar na maturação <i>in vitro</i> de embriões somáticos em frascos.....	81
4	CONCLUSÃO.....	91
	CAPÍTULO 3 Análises moleculares da embriogênese somática de murici-pequeno	100
1	INTRODUÇÃO.....	103
2	MATERIAL E MÉTODOS	105
2.1	Identificação dos genes	105
2.2	Material Vegetal.....	107
2.3	Extração de RNA	108
2.4	Obtenção da sequência cDNA.....	108
2.5	Amplificação dos fragmentos.....	108
2.6	Clonagem e transformação bacteriana	109
2.7	PCR de Colônia para confirmação da ligação e transformação.....	110
2.8	Extração dos plasmídeos contendo insertos dos cDNA obtidos.....	111
2.9	Sequenciamento dos plasmídeos.....	111
2.10	Análises das sequências de cDNA em Bancos de Dados	113
3	RESULTOS E DISCUSSÃO.....	114
3.1	Extração de RNA	114
3.2	Amplificação dos <i>primers</i>	115
3.3	PCR de Colônia para confirmação da ligação e transformação.....	116
3.4	Extração dos plasmídeos contendo insertos dos cDNA obtidos.....	117
3.5	Sequenciamento dos plasmídeos.....	118
3.6	Análises das sequências de cDNA em Bancos de Dados	119
4	CONCLUSÃO.....	122
	REFERÊNCIAS.....	124

CAPÍTULO 1

**Embriogênese somática e potencial uso de
marcadores moleculares embriogênicos de
Byrsonima intermedia A. Juss. (murici-pequeno).**

1 INTRODUÇÃO

A espécie *Byrsonima intermedia* A. Juss., conhecida popularmente como murici-pequeno, é um arbusto do cerrado considerado medicinal por sua propriedade adstringente nas diarreias e disenterias. Porém, a propagação por meio de sementes do gênero *Byrsonima* apresenta dificuldades como baixa taxa de germinação e emergência lenta das plântulas.

As técnicas de cultura *in vitro* são um promissor instrumento para o desenvolvimento de pesquisas que estabeleçam formas alternativas para a produção de mudas, conservação e melhoramento do material genético.

Dentre as técnicas de micropropagação destaca-se a embriogênese somática, que pode ser dividida em dois tipos. A embriogênese direta, que origina-se diretamente do tecido matriz, e a indireta, onde a embriogênese passa por fase intermediária.

A embriogênese somática, adventícia ou assexual são termos usualmente empregados para designar o processo pelo qual células haplóides ou somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas.

A iniciação da embriogênese somática é ativada por diferentes sinais e frequentemente começa a partir de diferentes tecidos, e isso não é totalmente entendido. Recentemente, pesquisas na área de biologia molecular têm sido utilizadas para investigar a embriogênese somática para melhor compreensão deste fenômeno.

As análises moleculares da embriogênese somática garantem uma oportunidade de entender como os eventos reprodutivos são interligados, coordenados e regulados.

Devido à dificuldade de propagação do murici-pequeno e em face de seu potencial medicinal, este trabalho teve por finalidade estabelecer um protocolo

de embriogênese somática e realizar análises moleculares das fases da embriogênese somática de murici-pequeno.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Descrição botânica e propriedades medicinais da espécie

A família Malpighiaceae compreende mais de 60 gêneros. É uma família com plantas herbáceas, arbustivas, arbóreas ou, mais frequentemente, trepadeiras com folhas inteiras, de disposição alterna, sem estípulas. As flores são vistosas, de coloração, em geral, amarela ou rosada, cíclicas, hermafroditas, diclamídeas, de simetria zigomorfa, reunidas em inflorescências paniculadas nas axilas superiores ou terminais. As pétalas, em geral, são fimbriadas, longipenduculadas. O androceu é formado por dez estames, às vezes alguns estaminodiais. Como exemplo brasileiro, podemos citar o gênero *Byrsonima*, com larga ocorrência no Cerrado (JOLY, 2002). Esse gênero é composto por aproximadamente 150 espécies e está amplamente distribuído na América Central e do Sul (AGUIAR; DADIV; DAVID, 2005), apresentando casca rica em taninos (CÁCERES et al., 1993; CORRÊA, 1984). O papel biológico dos taninos nas plantas tem sido investigado e acredita-se que ele esteja envolvido na defesa química contra o ataque de herbívoros e contra micro-organismos patogênicos (SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2000).

Lorenzi (2002) menciona que a taxa de germinação é baixa e a emergência é lenta em algumas espécies de *Byrsonima*, como *B. coccolobifolia*, *B. lancifolia*, *B. sericea*, *B. spicata*, *B. stipulacea* e *B. verbacifolia*. Além disso, as sementes apresentam dormência tegumentar.

A espécie *Byrsonima intermedia* A. Juss. é um arbusto, podendo apresentar vários ramos que partem de uma base subterrânea. Possui folhas opostas lanceoladas, duas glabras, flores em cachos terminais, amarelas, tomando tonalidade alaranjada quando velhas (FERRI, 1969). Conhecida popularmente como “murici-pequeno”, devido ao seu pequeno porte em comparação a outras

espécies do gênero. Sua época de florescimento é de outubro a dezembro e seu habitat é o Cerrado Brasileiro (RODRIGUES; CARVALHO, 2001).

Os frutos do murici-pequeno são do tipo drupóide, indeiscentes e apresentam como principal característica o endocarpo lignificado, constituindo o pirênio (endocarpo lenhoso que envolve completamente a semente) indeiscente. Quando maduros apresentam dimensões de 7,70-11,00 mm × 7,77-10,78 mm e massa fresca de 0,29-0,71 g. Têm formato ligeiramente ovalado e coloração amarela, de consistência carnosa, formado por um pirênio muito lenhoso e trilobular, onde podem ser encontradas até três sementes maduras que medem 2,2-4,3 mm × 2,1-3,5 × 1,3-2,4 mm e são bitegumentadas. Os tegumentos são bastante reduzidos, com células colapsadas. A testa é composta por resíduos celulares impregnados de compostos fenólicos e o endotégmen é formado por paredes lignificadas de uma camada celular uniseriada caracterizando uma semente endotégma. O embrião é axial e contínuo apresentando um curto eixo hipocótilo-radicular (hr) continuando em dois cotilédones adjacentes e enrolados em espiral entre si, caracterizando o tipo circinado. A protoderme dos cotilédones é recoberta por uma cutícula delgada que armazena gotículas lipídicas e compostos fenólicos, bem como o meristema fundamental. Neste, as células mais próximas da protoderme apresentam predomínio de compostos fenólicos enquanto que as células mais internas, próximas ao centro do cotilédone, apresentam predomínio de gotículas lipídicas. O tegumento externo da semente apresenta estruturas como: testa composta por resíduos celulares impregnados de compostos fenólicos e o endotégmen formado por paredes lignificadas de uma camada celular unisseriada (SOUTO; OLIVEIRA, 2005).

O murici-pequeno é, como todo o gênero *Byrsonima*, uma planta rica em taninos, cuja infusão da casca é utilizada como febrífugo e adstringente nas diarreias e disenterias (RODRIGUES; CARVALHO, 2001), além de possuir atividade antisséptica, antimicrobiana, anti-hemorragica, cicatrizante e anti-

inflamatória (CARVALHO, 2010; MONTEIRO; ALBUQUERQUE; ARAÚJO, 2005; PINTO; BERTOLUCCI, 2002). A principal utilização medicinal se dá por meio do chá da casca do caule picada e a coleta do material silvestre é realizada de forma extrativista, o que coloca a espécie em grande risco de extinção.

Pesquisas têm focado seus estudos na descoberta de metabólitos secundários, em extratos desta planta, que possuam atividade biológica. Estudos conduzidos por Alves et al. (2000) revelaram que o extrato metanólico obtido a partir das folhas de *B. intermedia* mostrou-se promissor ao combate da esquistossomose por sua atividade molusquicida. A esquistossomose, causada pelo parasita *Schistosoma mansoni*, é uma doença endêmica no Brasil e em muitos outros países tropicais (DAVIS, 1996).

Carvalho (2010) trabalhando com murici-pequeno observou que os extratos metanólicos da casca, folhas e flores apresentaram efeito anti-inflamatório em larva de zebrafish (*Danio rerio*) com lesão na barbatana caudal. A propriedade anti-inflamatória foi confirmada em uma fração purificada dos extratos metanólicos. Os principais compostos bioativos encontrados nos extratos da casca e folhas foram β -amirina e epicatequina. O ácido gálico foi outro metabólito secundário presente nos extratos da casca.

2.2 Cultivo *in vitro* e cultura de calos

A cultura de tecidos vegetais, a ciência do crescimento das células vegetais, tecidos ou órgãos isolados de planta-mãe, em meio artificial, são importantes instrumentos para a propagação clonal de plantas livres de patógenos, produção de haplóides, modificação genética, resgate de embriões, fertilização *in vitro*, conservação de germoplasma e produção de metabólitos secundários (GEORGE, 2008; RAZDAN, 2003). Com a demanda crescente da indústria de fármacos e a necessidade de conservação de germoplasma, esta

técnica tem sido extensamente empregada para a propagação e conservação de espécies medicinais (ROUT; SAMANTARAY; DAS, 2000).

A regeneração de um novo indivíduo, em condições assépticas, pode ocorrer a partir de uma única célula, uma vez que cada célula carrega a informação genética necessária para esta finalidade. Tal processo é conhecido por totipotência celular e é característico de tecidos jovens e meristemáticos. Explantes comumente utilizados no crescimento *in vitro* podem apresentar células com crescimento organizado (meristema, caule, nódulo de raiz e culturas isoladas de embriões) ou desorganizado (calos e células em suspensão de células) (GEORGE, 2008).

Entre os explantes com células de crescimento desorganizado, os calos são os mais comumente utilizados. O calo pode ainda apresentar certo grau de diferenciação (GEORGE, 2008; TORRES et al., 2000). Essa massa celular desenvolve-se em resposta a injúrias físicas ou químicas (GEORGE, 1996).

Segundo Grattapaglia e Machado (1998), para ocorrer a indução do calo, qualquer tecido pode ser utilizado como explante. Entretanto, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que apresentem maior capacidade de expressar a totipotência. Pierik (1990) comenta que explantes oriundos de tecidos jovens, não lignificados, são mais apropriados para a cultura de tecidos, por possuírem alta capacidade de regeneração. A cultura de calos pode ser derivada de diferentes órgãos da planta (raiz, segmentos caulinares, folhas) ou de células específicas (endosperma, pólen).

De acordo com Vietez e San-José (1996), muitas vezes é necessário o suprimento exógeno de reguladores de crescimento para a indução de calos. O balanço hormonal obtido entre os níveis de citocininas e auxinas, exógenas e endógenas à planta, pode estimular a proliferação celular. Porém, Ozias-Akins e Vasil (1985) mencionam que citocininas exógenas nem sempre são necessárias e que muitos tecidos desenvolvem-se *in vitro* apenas com suprimento de auxinas.

Dentre os reguladores de crescimento mais utilizados na indução de calos destacam-se o ácido diclorofenóxico acético (2,4-D), o ácido naftalenoacético (ANA) e, mais recentemente, o thidiazuron (TDZ).

A calogênese depende de fatores importantes, como a seleção do explante, meio de cultura adequado e condições ambientais. O meio nutritivo deve conter sais, fonte de carbono, vitaminas e reguladores de crescimento em concentrações adequadas à calogênese. Quanto às condições da cultura, a temperatura pode ser entre 25°C e 30°C e pode ocorrer na luz, no escuro ou em baixa irradiância. A cultura é geralmente feita em meio sólido e a textura do calo pode variar de compacta a friável. A cultura de calos pode ser utilizada para o isolamento de protoplastos, estudo do tipo celular, seleção celular, embriogênese somática, organogênese e produção de metabólitos secundários (PINTO; LAMEIRA, 2001).

Mas durante o processo de cultivo *in vitro* existem problemas que dificultam o seu estabelecimento. Isso ocorre devido às plantas serem expostas a diferentes condições de estresse que, frequentemente, leva ao desenvolvimento da desordem morfológica e fisiológica, e essa desordem é denominada hiper-hidricidade (DEBERGH et al., 1992; SAHER et al., 2004; ZIV, 1991, 1995).

Plantas hiper-hídricas são caracterizadas por apresentarem baixos níveis de lignina e celulose (KEVERS et al., 1984); baixa resistência de parede celular (KEVERS; GASPAR, 1986); hipertrofia celular (VIEITEZ et al., 1985); folhas entumescidas e quebradiças (DEBERGH, 1983; LESEHEM; WERKER; SHALEV, 1988; ZIV; ACHWERTZ; FLEMINGER, 1987) e reduzida taxa de sobrevivência em condições autotróficas (SUTTER; LANGHANS, 1979).

A hiper-hidricidade é uma das principais anomalias que tem recebido atenção especial nos últimos anos, tendo sido observada a interação simultânea de diversos fatores, interferindo nas principais vias metabólicas como fotossíntese, respiração e transpiração (ZIV, 1991). Uma relação entre a hiper-

hidricidade e a atividade de determinadas enzimas foi diagnosticada (DAGUIN; LETOUZÉ, 1986).

O estado físico e químico do meio de cultura, em particular, o vapor d'água, CO₂ e etileno, estão associados com a morfogênese anormal dos brotos (ZIV, 1991). Os meios de cultivo são, em geral, líquidos ou semissólidos. O aumento da concentração de ágar ou de outro agente gelificante afeta a disponibilidade de água e de vários componentes do meio, em particular, as citocininas, reduzindo a hiper-hidricidade (DEBERGH; HARBAOUI; LEMEUR, 1981). No entanto, muitas vezes, este fato é acompanhado por decréscimo nas taxas de propagação (FRANCK et al., 1997; SAHER et al., 2005; WILLIAMS; TAJI, 1991; ZIV, 1991).

Um problema encontrado frequentemente com ágar, o principal agente gelificante, é a variação na qualidade e pureza entre as diversas marcas e entre lotes de uma mesma marca. Devido a este problema tem aumentado o uso do Gelrite, que é um polissacarídeo extracelular complexo produzido por *Pseudomonas elodea*, que contém menos minerais livres que o Ágar. Este agente bacteriano, além de ser mais puro, tem sido utilizado devido à baixa quantidade necessária para obter um resultado semelhante ao do Ágar, quanto à solidificação do meio. Porém, a estrutura física do Gelrite parece permitir que os brotos absorvam em maior intensidade substâncias que podem induzir à hiper-hidricidade, como as citocininas, íons de amônia e água e, com isso, causar ou aumentar este fenômeno nos brotos regenerantes (FRANCK et al., 1997).

Entre os fatores externos promotores da hiper-hidricidade estão os reguladores de crescimento, em particular, as citocininas, que constituem um grupo de fitorreguladores indispensáveis para a quebra da dominância apical e indução de gemas axilares (PAEK; HAHN, 2000; ZIV, 1991).

Enquanto o uso de citocinina estimula maior produção de parte aérea, o excesso é tóxico e compromete o desenvolvimento das culturas. A toxidez por

citocinina no meio se caracteriza, principalmente, pelo excessivo entufamento e falta de alongamento das culturas, redução no tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento excessivo dos caules e hiper-hidricidade generalizada, com consequente dificuldade na etapa de enraizamento (LESHEM; WERKER; SHALEV, 1988).

Além dos reguladores de crescimento, a luz também pode influenciar a taxa de multiplicação e o crescimento *in vitro*. Os componentes, comprimento de onda e densidade de fluxo luminoso podem ter efeitos positivos e/ou negativos no cultivo *in vitro* (KODYM; ZAPATA-ARIAS, 1999; KOZAI et al., 1991; SEABROOK, 1987).

Outro ponto importante para o aumento da hiper-hidricidade seria o uso de carvão ativado. Segundo Kadota, Imizu e Hirano (2001), trabalhando com pereira (*Pyrus communis* L.), observou que o uso de carvão ativado aumentou o número de brotações hiper-hídrica.

Segundo Han et al. (1996), a hiper-hidricidade pode também ser intensificada em função do tipo de material utilizado no fechamento dos frascos de cultura e que brotos hiper-hídricos liberam mais CO₂ e menos etileno em relação aos não hiper-hídricos. Este fenômeno pode afetar a sobrevivência e adaptação das plantas cultivadas *in vitro* após sua transferência para o solo, aumentando sua suscetibilidade à contaminação por fungos e a produtos químicos (GRIBBLE et al., 1996; REUTHER, 1990).

2.3 Embriogênese somática

A embriogênese é o ponto inicial do ciclo de vida tanto para plantas como para animais. Em plantas, a embriogênese não é estritamente dependente de fertilização, pois muitas espécies produzem naturalmente embriões derivados assexuadamente em sementes (apomixia) ou podem ser induzidos para a

formação de embrião em cultura de tecidos. Em muitos casos, a adição de reguladores de crescimento ou um tratamento de estresse, são necessários para induzir o embrião (IKEDA; UMEHARA; KAMADA, 2006).

A embriogênese somática, adventícia ou assexual são termos usualmente empregados para designar o processo pelo qual células haplóides ou somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas. Dois padrões de embriogênese somática ocorrem *in vitro*. O primeiro padrão corresponde ao modelo direto, no qual os embriões somáticos originam-se dos tecidos-matrizes, sem a formação de estádios intermediários. O segundo corresponde ao modelo indireto, no qual os embriões se formam a partir de um calo, que apresenta vários estádios de diferenciação (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999).

A embriogênese somática direta passou a ser considerada para aqueles explantes que sofreram poucas divisões celulares antes da indução embriogenética. Embriogênese somática indireta seria aquela na qual os explantes passaram por um período longo de proliferação desorganizada, na forma de calos, antes da indução embriogenética propriamente dita. As células desses calos podem adquirir novas competências mediadas por mensageiros químicos específicos. Um exemplo clássico deste sistema é a indução da embriogênese somática em tecidos do floema secundário de cenoura (*Daucus carota* L.) (REINERT, 1958; STEWARD; MAPES; MEARS, 1958).

Sharp et al. (1980) sugeriram que a embriogênese somática direta era característica de explantes nos quais as células eram pré-determinadas para a rota embriogenética, como consequência da retenção de algumas propriedades das células meristemáticas parentais, das quais as células do explante derivam. Isto poderia explicar a tendência da embriogênese somática ocorrer preferencialmente em explantes derivados de tecidos embrionários ou juvenis. Já, a embriogênese somática indireta é considerada como característica de

explantes derivados de tecidos mais diferenciados, ou maduros, nas quais as células devem passar por vários ciclos antes de adquirir a condição embriogenética.

Uma vez que não se dispõe ainda de marcadores confiáveis para definir “competência embriogenética” torna-se difícil conceituar pré-determinação. Além disso, as características associadas à embriogênese direta ou indireta não necessariamente indicam diferenças substanciais nas características e atributos nas células envolvidas nesta rota morfogenética (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999).

Independentemente do padrão direto ou indireto, as células-mães embriogênicas apresentam um conjunto de características comuns ao comportamento de células embrionárias em divisão ativa. Estas características incluem o tamanho pequeno (100-200 μm), conteúdo citoplasmático denso, núcleos grandes com nucléolos proeminentes, vacúolos pequenos e presença de grãos de amido. As propriedades histoquímicas destas células sugerem intensa atividade metabólica e de síntese de RNA (SHARP et al., 1980; TISSERAT; ESAN; MURASHIGE, 1979; VASIL, 1982).

Apesar dos avanços verificados no estudo da embriogênese somática, ainda é limitada a compreensão dos estímulos e condições necessárias para a indução e controle desse processo. A possibilidade de manipulação deste sistema experimental para fins tecnológicos depende do domínio preciso de princípios de fisiologia do desenvolvimento. Desta maneira, morfogênese pode ser conceituada como a integração entre os processos decorrentes da divisão e diferenciação celular. Por determinação celular define-se o processo pelo qual o potencial de desenvolvimento de uma célula torna-se limitado a uma rota específica (CHRISTIANSON, 1985), e por competência celular a capacidade das células reagirem a sinais (que podem ser reguladores de crescimento) específicos de desenvolvimento (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999).

Um dos fatores principais das condições de indução de embriogênese somática é o balanço entre reguladores de crescimento. Embora as auxinas sejam os principais indutores, citocininas ou ácido abscísico (ABA) podem induzir a resposta embriogênica (NISHIWAKI et al., 2000). Neste caso, uma célula somática adquire competência para originar uma linhagem de células-filhas que irão formar embriões somáticos. O termo célula embriogênica tem sido empregado para designar aquelas células que já não necessitam mais de estímulos para produzir os embriões somáticos (JONG; SCHMIDT; VRIES, 1993). Células em transição entre célula somática e célula embriogênica são chamadas de células competentes (TOONEN et al., 1994). A indução embriogênica de uma célula somática não é exclusivamente dependente do uso de reguladores de crescimento. Choques térmicos, concentrações osmóticas, variações nos níveis de pH, de aminoácidos e sais (AMMIRATO, 1983; ARMSTRONG; GREEN, 1985; TOONEN; SCHMIDT; VRIES, 1996), ou mesmo a ausência de reguladores de crescimento (CHOI; YANG; CHOI, 1998), podem induzir competência embriogênica em células somáticas. A regeneração de plantas via embriogênese somática inclui cinco passos: 1º - iniciação das culturas embriogênicas pelo cultivo do explante primário em meio suplementado com reguladores de crescimento, principalmente auxinas, mas muitas vezes também citocininas; 2º - proliferação das culturas embriogênicas em meio sólido ou líquido suplementado com reguladores de crescimento de modo semelhante à iniciação; 3º - pré-maturação de embriões somáticos em meio sem reguladores de crescimento para inibir a proliferação e estimular a formação do embrião somático; 4º - maturação dos embriões somáticos pelo cultivo em meio suplementado com ABA e/ou com o potencial osmótico reduzido; e 5º - regeneração de plantas em meio sem reguladores de crescimento (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999).

A partir de uma lista de 65 espécies de dicotiledôneas revisadas por Raemakers, Jacobsen e Visser (1995), a embriogênese somática foi induzida em 17 espécies em meio de cultura livre de regulador de crescimento, em 29 espécies em meio contendo auxina e em 25 espécies em meio suplementado com citocinina. Entre as auxinas, a mais frequentemente utilizada foi o 2,4-D (49%) seguido do ANA (27%), ácido indol-acético (AIA) (6%), ácido indol butírico (AIB) (6%), picloram (5%) e dicamba (5%). No caso das citocininas, o N6-benzilaminopurina (BAP) foi utilizado em 57% das espécies com sucesso, seguido pela cinetina (KIN) (37%), zeatina (Zea) (3%) e TDZ (3%).

2.5 Análises moleculares

As análises moleculares garantem uma oportunidade de entender como os eventos reprodutivos são interligados, coordenados e regulados.

Tanto a iniciação da embriogênese zigótica como a somática são ativadas por diferentes sinais e frequentemente começam a partir de diferentes tecidos, e isto não é totalmente entendido. Recentemente, pesquisas na área de biologia molecular têm sido utilizadas para investigar a embriogênese. Vários genes, que são relacionados com a diferenciação celular, morfogêneses, tolerância à dessecação e transdução de sinal, são expressos durante este processo. Atualmente, este é o maior campo de pesquisa na área de biologia molecular (IKEDA; UMEHARA; KAMADA, 2006).

Certo número de genes tem sido identificado com a função específica de indução e manutenção da embriogênese em plantas. Os mais recentes fatores relacionados com a embriogênese são: *LEA*, *SERK*, *BBM*, *AGLII* e *LEC*.

As proteínas *LEA* (late-embryogenesis abundant) são estocadas em sementes e seus genes são expressos em fases tardias da embriogênese zigótica. Estes genes foram expressos tanto em culturas embriogênicas como em

sementes de cenoura, mas somente em tecidos embriogênicos e não em tecidos vegetativos. A expressão do gene *LEA* pode ser induzida quando embriões somáticos e zigóticos são tratados com ácido abscísico (ABA) (IKEDA-IWAI; SATOH; KAMADA, 2002).

O gene *SERK* (Somatic embryogenesis receptor kinase) foi isolado em tecido embriogênico de cenoura (*DcSERK*) (SCHMIDT et al., 1997) e tem sido expresso em embriões somáticos e zigóticos. Genes homólogos ao *DcSERK* foram isolados a partir de *Arabidopsis* (*AtSERK1*) e milho (*ZmSERK1*), além de outras espécies (BAUDINO et al., 2001; SOMLEVA; SCHMIDT; VRIES, 2000). Identificou-se, a partir de cinco possíveis homólogos de *SERK* em cana-de-açúcar (*Saccharum* sp), um clone específico denominado *SoSERK*, que mostrou 72% de similaridade com *AtSERK* em cana-de-açúcar. Outros membros da família multigênica *SoSERK* pertencem a grupos relacionados a outros homólogos da proteína *SERK* já descritas em mono e dicotiledôneas. O padrão de expressão deste gene mostrou-se como um marcador de células embriogênicas.

Vários homólogos de *DcSERK* foram identificados em monocotiledôneas, por exemplo, o milho (BAUDINO et al., 2001) e *Dactylis glomerata* (SOMLEVA; SCHMIDT; VRIES, 2000), e em dicotiledôneas, por exemplo, *Medicago truncatula* (NOLAN; IRWANTO; ROSE, 2003), *Arabidopsis thaliana* (HECHT et al., 2001) e *Helianthus annuus* (THOMAS et al., 2004).

O gene *SERK* codifica um receptor transmembrana que contém um domínio intracelular de proteína-Kinase e um domínio extracelular rico em repetições de leucina, pertencente a uma grande e diversificada família de receptores Kinases em vegetais (BECRAFT, 1998). *AtSERK1*, homólogo do cDNA *SERK* de cenoura, foi isolado de *A. thaliana* como um dos 5 membros de uma família gênica, sendo detectado por hibridização *in situ* em óvulos em

desenvolvimento. Em óvulos maduros, a expressão foi restrita ao saco embrionário, mas em todas as células. Nos estágios mais tardios, AtSerk1 foi expresso no endosperma, no zigoto e nos embriões até a fase de coração, quando então a expressão cessou (HECHT et al., 2001).

Expressão ecotópica de *AtSERK1* sob controle de um promotor constitutivo forte (35S: *AtSERK1*) mostrou que a frequência de iniciação de embriões somáticos foi aumentada em aproximadamente quatro vezes nas plântulas transgênicas, sugerindo que AtSerk1 aumentou a competência embriogênica (HECHT et al., 2001). A expressão do gene *AtSERK1* também foi observada no meristema apical do caule e cotilédones de plântulas de *A. thaliana* tratadas com auxina. Esses são os melhores locais nos quais calos embriogênicos emergem em *A. thaliana* (MORDHORTS; TOONEN; VRIES, 1998), embora também ocorram em folhas expressando ecotopicamente *leafy cotyledon 1 - LEF1* (LOTAN et al., 1998) ou *LEC2* (STONE et al., 2001). Essas observações indicam que a expressão de *AtSERK1* não é restrita a células embriogênicas, mas é característica daquelas capazes de responder a sinais hormonais para formar embriões somáticos (HECHT et al., 2001).

O gene *BABY BOOM (BBM)*, responsável pela conversão da fase vegetativa para fase embriogênica, foi isolado em *Brassica napus*, codifica um fator transcricional pertencente à família AP2/ERF e está relacionado com a proliferação e morfogênese durante a embriogênese. A expressão ectópica do *BBM* e do *AtBBM (Arabidopsis BBM)* em plantas transgênicas induziu a formação de embriões somáticos a partir de cotilédones e folhas (BOUTILIER et al., 2002).

Outros reguladores transcricionais, como o *LEC (Leafy cotyledon)* e o *AGL1 (AGAMOUS-like 1)*, também têm sido relacionados com a competência embriogênica em tecidos vegetais (HECK et al., 1995; LOTAN et al., 1998).

O *LEC* regula o destino embriogênico e a maturação da semente enquanto o *AGLI* é membro da família *MADS* que acumula nos tecidos embriogênicos e está relacionado com a regulamentação das fases do desenvolvimento do embrião (HECK et al., 1995; LOTAN et al., 1998).

A descoberta da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) trouxe enormes benefícios e desenvolvimentos científicos como o sequenciamento de genomas, a expressão de genes em sistemas recombinantes e o estudo de genética molecular. Ultimamente, uma inovação tecnológica resultante da PCR, denominada de PCR em tempo real, vem ganhando espaço nos laboratórios de pesquisa por apresentar a capacidade de gerar resultados quantitativos. Esta técnica permite o acompanhamento da reação e a apresentação dos resultados de forma mais precisa e rápida, em relação à PCR. Entre as vantagens da utilização do PCR em tempo real (RT-PCR) em relação à PCR qualitativa para os estudos de expressão de genes estão: a facilidade de quantificação, maior sensibilidade, maior precisão, reprodutibilidade e precisão, melhor análises, maior controle de qualidade de processo e menor risco de contaminação (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, R. M.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Unusual naphthoquinones, catechin and triterpene from *Byrsonima microphylla*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 66, n. 19, p. 2388-2392, Oct. 2005.
- ALVES, T. M. de A. et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 3, p. 367-373, maio/jun. 2000.
- AMMIRATO, P. V. Embryogenesis. In: EVANS, D. A. et al. (Ed.). **Handbook of plant cell culture**. New York: MacMillan, 1983. p. 82-123.
- ARMSTRONG, C. L.; GREEN, C. E. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. **Planta**, Berlin, v. 164, n. 2, p. 207-214, 1985.
- BAUDINO, S. et al. Molecular characterization of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the *SERK* gene family. **Planta**, Berlin, v. 213, n. 1, p. 1-10, May 2001.
- BECRAFT, P. W. Receptor kinases in plant development. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 3, n. 5, p. 384-388, May 1998.
- BOUTILIER, K. et al. Ectopic expression of *BABY BOOM* triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. **Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 8, p. 1737-1749, Aug. 2002.
- CACERES, A. et al. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory-diseases: 2., evaluation of activity of 16 plants against gram-positive bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 39, n. 1, p. 77-82, Feb. 1993.

CARVALHO, M. A. F. ***In vitro* culture, Cryopreservation and medicinal properties of *Byrsonima intermedia***. 2010. 196 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

CHOI, Y. E.; YANG, D. C.; CHOI, K. T. Induction of somatic embryos by macrosalt stress from mature zygotic embryos of *Panax ginseng*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 52, n. 3, p. 177-181, Jan. 1998.

CHRISTIANSON, M. L. An embryogenic culture of soybean: towards a general theory of somatic embryogenesis. In: HENKE, R. R. et al. (Ed.). **Tissue culture in forestry and agriculture**. New York: Plenum, 1985. p. 83-103.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1984. v. 6.

DAGUIN, F.; LETOUZÉ, R. Ammonium-induced vitrification in cultured tissues. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 66, n. 1, p. 94-98, 1986.

DAVIS, A. Schistosomiasis. In: COOK, G. C. (Ed.). **Manson' tropical diseases**. London: W. B. Saunders, 1996. p. 1413-1456.

DEBERGH, P. et al. Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 30, n. 2, p. 135-140, Feb. 1992.

DEBERGH, P.; HARBAOUI, Y.; LEMEUR, R. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypothesis to overcome vitrification with special reference to water potential. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 53, n. 2, p. 181-187, Oct. 1981.

DEBERGH, P. C. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 59, n. 2, p. 270-276, Oct. 1983.

FERRI, M. G. **Plantas do Brasil: espécies do cerrado**. São Paulo: E. Blücher, 1969. 239 p.

FRANCK, T. et al. Cytological comparison of leaves and stems of *Prunus avium* L. shoots cultured on a solid medium with Agar or gelrite. **Biotechnic and Histochemistry**, Baltimore, v. 73, n. 1, p. 32-43, Jan. 1997.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: part 1, the technology**. Edington: Exegetics, 1996. 574 p.

_____. Plant tissue culture procedure: background. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture**. Dordrecht: Springer, 2008. v. 1, p. 1-28.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. v. 1, p. 183-260.

GRIBBLE, K. et al. Environmental scanning electron microscopy of the surface of normal and vitrified leaves of *Gypsophila paniculata* (Babies Breath) cultured *in vitro*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 15, n. 4, p. 771-776, 1996.

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

HAN, B. et al. Effect of different sealing materials on CO₂ and ethylene concentration in culture vessel, and growth and vitrification of *Gypsophila paniculata* "Bristol Fairy". **Journal of the Korean Society for Horticultural Science**, Seoul, v. 37, n. 1, p. 118-122, 1996.

HECHT, V. et al. The arabidopsis somatic embryogenesis receptor kinase 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic

competence in culture. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 127, n. 1, p. 803-816, Dec. 2001.

HECK, G. R. et al. AGL15, a MADS domain protein expressed in developing embryos. **Plant Cell**, Rockville, v. 7, n. 8, p. 1271-1282, Aug. 1995.

IKEDA, M.; UMEHARA, M.; KAMADA, H. Embryogenesis-related genes: its expression and roles during somatic and zygotic embryogenesis in carrot and Arabidopsis. **Plant Biotechnology**, New York, v. 23, n. 10, p. 153-161, Dec. 2006.

IKEDA-IWAI, M.; SATOH, S.; KAMADA, H. Establishment of a reproducible tissue culture system for the induction of *Arabidopsis* somatic embryos. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 374, p. 1575-1580, Mar. 2002.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Nacional, 2002. 777 p.

JONG, A. J. de; SCHMIDT, E. D. L.; VRIES, S. C. Early events in higher-plant embryogenesis. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 22, n. 2, p. 367-377, May 1993.

KADOTA, M.; IMIZU, K.; HIRANO, T. Double-phase *in vitro* culture using sorbitol increases shoot proliferation and reduces hyperhydricity in Japanese pear. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 89, n. 3, p. 207-215, July 2001.

KEVERS, C. et al. Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 61, n. 1, p. 69-74, May 1984.

KEVERS, C.; GASPAR, T. Vitrification of carnation *in vitro*: changes in water content, extracellular space, air volume, and ion levels. **Physiologic Végétale**, Paris, v. 24, n. 6, p. 647-653, 1986.

KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F. J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. "Grande Naine"). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 55, n. 2, p. 141-145, Nov. 1999.

KOZAI, T. et al. Photoautotrophic and photomixotrophic growth of strawberry plantlets *in vitro* and changes in nutrient composition of the medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 25, n. 2, p. 107-115, Dec. 1991.

LESHEM, B.; WERKER, E.; SHALEV, D. P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. **Annals of Botany**, London, v. 62, n. 3, p. 271-276, June 1988.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo: Nova Odessa, 2002. v. 1, 386 p.

LOTAN, T. et al. *Arabidopsis* leafy cotyledon 1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. **Cell**, Cambridge, v. 93, p. 1195-1205, June 1998.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. de L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 892-896, set./out. 2005.

MORDHORTS, A. P.; TOONEN, M. A. J.; VRIES, S. Plant embryogenesis. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Cleveland, v. 16, n. 6, p. 535-576, 1997.

NISHIWAKI, M. et al. Somatic embryogenesis induced by the simple application of abscisic acid to carrot (*Daucus carota* L.) seedlings in culture. **Planta**, Berlin, v. 211, n. 5, p. 756-759, Oct. 2000.

NOLAN, K. E.; IRWANTO, R. R.; ROSE, R. J. Auxin up regulates MtSERK1 expression in both *Medicago truncatula* root forming and embryogenic cultures. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 133, n. 1, p. 218-230, Sept. 2003.

- NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 33, p. 10-13, 2004.
- OZIAS-AKINS, P.; VASIL, I. K. Nutrition of plant tissue cultures. In: VASIL, I. K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants: cell growth, nutrition, cytodifferentiation and cryopreservation**. Davis: Academic, 1985. v. 2, p. 128-147.
- PAEK, K. Y.; HAHN, E. J. Cytokinins, auxins and activated charcoal affect organogenesis and anatomical characteristics of shoot-tip cultures of *Lisianthus* [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn]. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Wallingford, v. 36, n. 2, p. 128-132, Mar./Apr. 2000.
- PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. New York: M. Nijoff, 1990. 326 p.
- PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. **Textos acadêmicos: cultivo e processamento de plantas medicinais**. Lavras: FAEPE/UFLA, 2002. 169 p.
- PINTO, J. E. B. P.; LAMEIRA, O. A. **Micropropagação e metabólitos secundários *in vitro* de plantas medicinais**. Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 101 p.
- RAEMAKERS, C. J. J. M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. **Euphytica**, Wageningen, v. 81, n. 1, p. 93-107, Oct. 1995.
- RAZDAN, M. K. **Introduction to plant tissue culture**. Enfield: Science, 2003. 375 p.
- REINERT, J. Morphogenese und ihre kontrolle an geweberkulturen aus karotten. **Naturwissenschaften**, v. 45, p. 344-345, 1958.

REUTHER, G. Stimulation of the photoautotrophy of *in vitro* plants. In: INTERNATIONAL HORTICULTURAL CONGRESS, 23., 1990, Firenze. **Abstracts...** Firenze: ISHS, 1990. p. 59-76.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. de. **Plantas medicinais no domínio dos cerrados**. Lavras: UFLA, 2001. 180 p.

ROUT, G. R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, n. 2, p. 91-120, Apr. 2000.

SAHER, S. et al. Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 120, n. 1, p. 152-161, Jan. 2004.

_____. Prevention of hyperhydricity in micropropagated carnation shoots by bottom cooling: implications of oxidative stress. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 81, n. 2, p. 149-158, Sept. 2005.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: UFSC, 2000. p. 597-622.

SCHMIDT, E. D. L. et al. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. **Development**, Cambridge, v. 124, n. 10, p. 2049-2062, May 1997.

SEABROOK, J. E. A. Changing the growth and morphology of potato plantlets *in vitro* by varying the illumination source. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 212, p. 401-410, 1987.

SHARP, W. R. et al. The physiology on *in vitro* asexual embryogenesis. **Horticultural Reviews**, New York, v. 2, p. 268-310, 1980.

SOMLEVA, M. N.; SCHMIDT, E. D. L.; VRIES, S. C. Embryonic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by SERK expression. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 7, p. 718-726, Sept. 2000.

SOUTO, L. S.; OLIVEIRA, D. T. Morfoanatomia e ontogênese do fruto e semente de *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 697-712, jul./ago. 2005.

STEWART, F. C.; MAPES, M. O.; MEARS, K. Growth and organized development of cultured cells: II., organization in cultures from freely suspended cells. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 45, p. 705-708, 1958.

STONE, S. L. et al. Leafy COTYLEDON 2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 98, n. 20, p. 11806-11811, Sept. 2001.

SUTTER, E. G.; LANNGHANS, R. W. Epicuticular formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Saint Joseph, v. 104, n. 4, p. 493-496, 1979.

THOMAS, C. et al. Spatial expression of a sunflower SERK gene during induction of somatic embryogenesis and shoot organogenesis. **Plant Physiology Biochemistry**, New Delhi, v. 42, n. 1, p. 35-42, Jan. 2004.

TISSERAT, B.; ESAN, B. B.; MURASHIGE, T. Somatic embryogenesis in angiosperms. **Horticultural Reviews**, New York, v. 1, n. 1, p. 1-78, 1979.

TOONEN, M. A. J. et al. Description of somatic-embryo-forming single cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking. **Planta**, Berlin, v. 194, n. 4, p. 565-572, Mar. 1994.

TOONEN, M. A. J.; SCHMIDT, E. D. L.; VRIES, S. C. Cell tracking as a tool to study initial processes in somatic embryo development. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, Rehovot, v. 2, n. 1, p. 3-10, 1996.

TORRES, A. C. et al. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: EMBRAPA Hortaliças, 2000. 128 p.

VASIL, I. K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cereals and grasses. In: FUJIWARA, A. (Ed.). **Plant tissue culture**. Tokyo: Maruzen, 1982. p. 101-103.

VIEITEZ, A. M. et al. Anatomical and chemical studies of vitrified shoots of chestnut regenerated *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 65, n. 2, p. 177-184, Oct. 1985.

VIETEZ, A. M.; SAN-JOSÉ, M. C. Adventitious shoot regeneration from *Fagus sylvatica* leaf explants *in vitro*. **In vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Columbia, v. 32, n. 3, p. 140-147, Mar. 1996.

WILLIAMS, R. R.; TAJI, A. M. Effect of temperature, gel concentration and cytokinins on vitrification of *Olearia microdisca* (J.M. Black) *in vitro* shoot cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 26, n. 1, p. 1-6, Feb. 1991.

ZIV, M. *In vitro* acclimatization. In: AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T.; SMITH, M. A. L. (Ed.). **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 493-516.

_____. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation: technology and applications**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 45-69.

ZIV, M.; ACHWERTZ, A.; FLEMINGER, D. Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus*) plants propagated *in vitro*: implications for hardening. **Plant Science**, Shannon, v. 52, n. 1/2, p. 127-134, May 1987.

CAPÍTULO 2

Embriogênese somática *in vitro* de murici-pequeno

RESUMO

O gênero *Byrsonima*, especialmente a espécie *B. intermedia*, é um arbusto do cerrado brasileiro que tem sido amplamente utilizado por suas características alimentares e terapêuticas. Mas sua propagação sexuada apresenta problemas e a embriogênese somática surge como uma opção para sua propagação. Assim, objetivou-se neste estudo determinar um protocolo e avaliar aspectos da expressão gênica associada ao processo de indução de embriogênese somática de murici-pequeno. Para a indução de calos a partir de folhas de plântulas germinadas *in vitro*, foram testados diferentes subcultivos (60 dias) e concentrações de diferentes citocininas (BAP, TDZ, ZEA e CIN) combinados com concentrações de ANA. Diferentes concentrações de ANA também foram avaliadas na indução de calos pró-embriogênicos. Para a indução de calos embriogênicos e embriões somáticos, os calos pró-embriogênicos foram subcultivados em meio MS sem a adição de reguladores de crescimento. Os embriões somáticos originados foram inoculados em meio de maturação contendo diferentes concentrações de GA₃ e de ABA. A formação de embriões secundários, o controle da hiper-hidricidade, o efeito de diferentes concentrações de sacarose e meios de cultura, diferentes vedações e concentrações de ágar também foram avaliadas. Os resultados mostram que para a indução de embriões somáticos, o uso de cinetina juntamente com ANA apresentou formação de embriões somáticos no segundo (4,76 μM de CIN + 0,54 μM de ANA) e terceiro (5,17 μM de CIN + 10,54 μM de ANA) subcultivos. O uso de alta concentração de ANA (537,06 μM) favoreceu a formação de embriões somáticos. O uso de GA₃ na concentração de 28,87 μM favoreceu a formação de plântulas. O uso de tampas sem PVC e tampa comercial Biosama® apresentaram melhores resultados para tubos de ensaio e para frascos, respectivamente. O meio de cultura WPM suplementado com 3% de sacarose e solidificado com 0,8% de ágar reduziu a hiper-hidricidade de embriões somáticos.

Palavras-chave: *Byrsonima intermedia* A Juss., embriões somáticos, calos embriogênicos, hiper-hidricidade.

ABSTRACT

Byrsonima, especially the species *B.intermedia*, is a Brazilian plant that has been widely used as food and for its therapeutic characteristics. However, the plant has problems with sexual propagation and somatic embryogenesis has emerged as a viable alternative option for propagation. Therefore, this study aimed to establish a protocol and analyze aspects of the gene expression associated with the process of inducing the somatic embryogenesis in murici-pequeno. For the induction of callus from seedlings in vitro's leaves different subcultures were tested (60 days) and concentrations of different cytokinins (BAP, TDZ, KIN and ZEA) combined with concentrations of NAA. Different concentrations of NAA were also analyzed in the induction of pro-embryogenic calli. For the induction of embryogenic calli and somatic embryos, the pro-embryogenic calli were subcultured on MS area without adding growth regulators. The somatic embryos originated were inoculated in maturation medium containing different concentrations of GA₃ and ABA. The formation of secondary embryos, the control of hyperhydricity, the effect of different sucrose concentrations and culture media, different agar seals and concentrations were also analyzed. Molecular analyses were performed in different explants (pro-embryogenic and embryogenic calluses and somatic embryos). The results show that for the induction of somatic embryos, the use of kinetin with NAA presented the formation of somatic embryos in the second (4.76 µM CIN + 0.54 µM NAA) and third (5.17 µM CIN + 10.54 µM NAA) subcultures. The use of high concentrations of NAA (537.06 µM) favored the formation of somatic embryos. The use of GA₃ in the concentration of 28.87 µM favored the formation of seedlings. The use of caps without PVC and Biosama[®] cap presented better results for test tubes and vials, respectively. The WPM medium supplemented with 3% of sucrose and solidified with 0.8% of agar reduced the hyperhydricity of somatic embryos.

Keywords: *Byrsonima intermedia* A. Juss., somatic embryos, embryogenic calluses, hyperhydricity.

1 INTRODUÇÃO

O Murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A Juss.) é uma planta medicinal e nativa do cerrado (RODRIGUES; CARVALHO, 2001). Recentemente, investigações químicas com algumas espécies do gênero *Byrsonima* obtiveram resultados no isolamento de diversos compostos de interesse farmacológico (SANNOMIYA et al., 2007). Além disso, esta espécie apresenta dificuldades de propagação por meios convencionas devido à baixa taxa de germinação e emergência lenta de plântulas (LORENZI, 2002).

Nesse contexto, as técnicas de cultivo *in vitro* constituem um promissor instrumento para o desenvolvimento de pesquisas que estabeleçam formas alternativas para a produção de mudas, conservação e melhoramento do material genético. A cultura de tecidos de plantas é considerada bastante eficaz na propagação de várias espécies, permitindo o crescimento de células, tecidos e órgãos isolados da planta-mãe, em condições assépticas e controladas. Com a demanda crescente da indústria de fármacos e a necessidade de conservação de germoplasma, esta técnica tem sido extensamente empregada para a propagação e conservação de espécies medicinais (ROUT; SAMANTARAY; DAS, 2000). A regeneração *in vitro* pode ser realizada por duas vias distintas: a organogênese e a embriogênese somática. No primeiro caso, brotos e raízes formam-se sequencialmente, enquanto que na embriogênese somática, células somáticas originam estruturas semelhantes a embriões zigóticos (GEORGE, 1996).

A embriogênese somática, adventícia ou assexual são termos usualmente empregados para designar o processo pelo qual células haplóides ou somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas. Dois padrões de embriogênese somática ocorrem *in vitro*. O primeiro padrão corresponde ao modelo direto, no qual os embriões somáticos originam-se dos tecidos-matrizes, sem a passagem

por estádios intermediários de calo. O segundo corresponde ao modelo indireto, no qual os embriões se formam a partir de um calo, que apresenta diferentes estádios de diferenciação (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1998).

No entanto, plantas *in vitro*, desenvolvidas em pequenos frascos são expostas a sais, carboidratos e reguladores de crescimento em altas concentrações, além de alta umidade relativa e baixa irradiância, o que interfere nos potenciais hídrico e osmótico do meio, bem como nas trocas de CO₂ e O₂ entre o interior dos frascos e o ambiente externo (FONTES et al., 1999; PARK et al., 2004; ZIV, 1995). Isto frequentemente ocasiona o surgimento de desordens morfofisiológicas que dificultam seu desenvolvimento. Essas desordens são denominadas de hiper-hidricidade (ou hiper-hidricidade) (SAHER et al., 2004; ZIV, 1991).

Devido a essas características, o desenvolvimento de um protocolo de regeneração de plantas via embriogênese somática, levando em consideração a hiper-hidricidade dos embriões somáticos, é importante para fornecer mudas aos programas de conservação do cerrado e também fornecer material biológico para pesquisas de interesse farmacológico e da biotecnologia.

Com isso, o presente trabalho apresenta como objetivo a elaboração de um protocolo para a obtenção de mudas de murici-pequeno por meio da técnica de embriogênese somática *in vitro*, levando em consideração a obtenção de plântulas normais (não hiper-hídricas).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

2.1.1 Germinação *in vitro*

Frutos maduros de murici-pequeno foram coletados de populações naturais localizadas no município de Ijaci, região sul do Estado de Minas Gerais, localizado a 918,0 m de altitude, 21°14'S de latitude e longitude 44,9°00'W GRW.

Após a coleta, os frutos passaram por processo de beneficiamento, com retirada da polpa, imersão em hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M por 5 minutos e lavagem em água corrente com auxílio de peneira por 10 minutos.

A abertura dos endocarpos foi realizada manualmente com o auxílio de morsa. Após a retirada das sementes, essas foram imersas em álcool 70% (v/v) por 30 segundos e, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 0,5% de cloro ativo por 5 minutos. Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram lavadas em água destilada autoclavada, de acordo com o protocolo estabelecido por Nogueira et al. (2004). Em seguida, foram inoculadas em tubos de ensaio contendo o meio de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) metade de suas concentrações salinas, sem adição de sacarose. O meio foi solidificado com ágar 0,7% e o pH foi aferido para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C, durante 20 minutos. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 30 dias.

2.1.2 Obtenção de calos

De acordo com o protocolo estabelecido por Nogueira et al. (2007), segmentos foliares de tamanho de 0,25 cm², obtidos de plântulas germinadas *in vitro*, foram inoculados em tubos de ensaio contendo o meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 4,53 µM de 2,4-D e 3% de sacarose. O meio de cultura foi solidificado com 0,7% de ágar e o pH foi ajustado em 5,8 antes da autoclavagem a 121°C por 20 minutos. Antes da inoculação, foram efetuados cortes na superfície adaxial do explante, a qual ficou em contato com o meio nutritivo.

As culturas foram incubadas no escuro à temperatura de 25 ± 2°C por 30 dias. Após este período, os calos foram subcultivados três vezes utilizando o mesmo meio de cultura, sendo o período de 60 dias para cada subcultivo.

2.2 Indução de calos pró-embriogênicos

2.2.1 Fontes e concentrações de citocininas e ANA

A cada subcultivo (60 dias) os calos foram repicados em meio MS suplementado com diferentes fontes de citocininas [Benzilaminopurina (BAP), Zeatina (Zea), Thidiazuron (TDZ) e Cinetina (CIN)] (Tabela 1) e a auxina ANA (ácido naftaleno acético) (0; 0,54; 5,37; 10,74 µM), em todas as combinações possíveis. O meio foi acrescido de 3% de sacarose e 0,1% de carvão ativado, solidificado com 0,7% de ágar e o pH foi ajustado em 5,8 antes da autoclavagem a 121°C por 20 minutos.

Tabela 1 Diferentes concentrações de citocininas (BAP, Zeatina, Thiadizuron e Cinetina) utilizados na indução de calos pró-embriogênicos de murici-pequeno em meio de cultura MS na presença de luz.

Citocininas	Concentrações (μM)
BAP	0; 0,45; 2,23; 4,47; 13,41
TDZ	0; 0,47; 2,27; 4,65; 13,62
ZEA	0; 2,28; 4,56; 9,12; 22,80; 45,61
CIN	0; 0,47; 4,65; 9,29

Após a inoculação, os calos foram mantidos em sala de crescimento por 60 dias, à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, irradiância de fótons de $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas.

2.2.2 Efeito de altas concentrações de ANA

Calos oriundos de cada subcultivo foram repicados em meio MS suplementado com altas concentrações de ANA (268,52 e 537,06 μM) e sua ausência. Foi adicionado ao meio 3% de sacarose e 0,1% de carvão ativado. O meio foi solidificado com 0,7% de ágar e seu pH ajustado para 5,8. O meio foi autoclavado à temperatura de 121°C por 20 minutos.

Após a inoculação, os calos foram mantidos em sala de crescimento por 60 dias, à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, irradiância de fótons de $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas.

2.3 Indução de calos embriogênicos e embriões somáticos

Os calos pró-embriogênicos, obtidos dos subcultivos nos itens 2.2.1 e 2.2.2, foram transferidos para tubos de ensaio contendo o meio MS

suplementado com 3% de sacarose e 0,1% de carvão ativado. O meio foi solidificado com 0,7% de ágar e o pH foi ajustado em 5,8 antes da autoclavagem a 121°C por 20 minutos. A origem da indução de calos pró-embriogênicos foi marcada para futuras identificações. Após a inoculação, os calos pró-embriogênicos foram mantidos em sala de crescimento à $27 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, irradiância de fótons de $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas.

Foram avaliadas após 60 dias, a formação de calos embriogênicos e de embriões somáticos.

2.4 Maturação de embriões somáticos

2.4.1 Efeito do ácido giberélico (GA_3)

Os embriões nas fases cordiforme e torpedos obtidos no item 2.3 foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS e solidificados com 0,7% de ágar, suplementado com 3% de sacarose, 0,1% de carvão ativado e diferentes concentrações de ácido giberélico (GA_3) (0; 2,89; 5,77; 14,43 e 28,87 μM). O meio teve seu pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C por 20 minutos.

Após a inoculação, os embriões foram mantidos por 15 dias em sala de crescimento à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, na ausência de luz para alongamento inicial dos embriões e evitar a foto-inibição. Após esse período, os embriões foram levados para a presença de luz com irradiância de $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas, onde permaneceram por 60 dias. Após este período, foram avaliados o número de plântulas formadas, número de plântulas normais e hiper-hídricas, formação de raiz, calos embriogênicos e embriões somáticos secundários.

2.4.2 Efeito do ácido abscísico (ABA)

Os embriões nas fases cordiforme e torpedo obtidos no item 2.3 foram inoculados em frascos contendo 30 mL meio de cultura WPM solidificado com 0,8% de ágar e suplementado com 3% de sacarose, 0,1% de carvão ativado e diferentes concentrações de ácido abscísico (ABA) (0; 0,38; 1,89; 3,78; 7,56 e 11,34 μM). O meio teve seu pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C por 20 minutos.

Após a inoculação, os embriões foram mantidos por 15 dias em sala de crescimento à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, na ausência de luz para alongamento inicial dos embriões e evitar a foto-inibição. Após este período, os embriões foram levados para a presença de luz com irradiância de $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas, onde permaneceram por mais 30 dias. Após este período, foram avaliados o número de plântulas formadas, número de plântulas normais e hiper-hídricas, formação de raiz, formação de calos embriogênicos secundários e embriões somáticos.

2.5 Indução de embriões somáticos secundários

Os embriões na fase cordiforme e torpedos obtidos no item 2.3 foram inoculados em frascos contendo 30 mL de diferentes meios de cultura, solidificados com 0,7% de ágar e suplementado com 3% de sacarose, 0,1% de carvão ativado e diferentes concentrações de ácido giberélico (GA_3) (0; 2,88 e 8,66 μM). Foram utilizados três tipos de vedação (tampa convencional, tampa com membrana e tampa Biosama[®]).

O meio teve seu pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C por 20 minutos.

Após a inoculação, os embriões foram mantidos por 30 dias em sala de crescimento à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, na presença de luz com irradiância de $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas.

Após este período, avaliou-se a massa de matéria fresca de embriões secundários por frasco e o número de embriões secundários por frasco.

2.6 Controle da hiper-hidricidade na embriogênese somática de murici-pequeno

2.6.1 Uso de diferentes concentrações de sacarose e meios de cultura

Os embriões cordiformes e torpedos obtidos no item 2.3 foram inoculados em frascos contendo 30 mL de diferentes meios de cultura (MS e WPM), solidificado com 0,8% ágar e suplementado com diferentes concentrações de sacarose (3; 4; 5 e 6%). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C por 20 minutos.

Após a inoculação, os embriões foram mantidos por 30 dias em sala de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, na presença de luz com irradiância de $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas.

Após este período, foi avaliado o número de plântulas formadas, número de plântulas normais e hiper-hídricas, formação de raiz, formação de calos embriogênicos e de embriões secundários.

2.6.2 Tipos de vedação para tubo de ensaio e concentrações de ágar na maturação *in vitro* de embriões somáticos

Os embriões cordiformes e torpedos obtidos no item 2.3 foram inoculados em tubo de ensaio contendo 10 mL em meio de cultura WPM,

solidificado com diferentes concentrações de ágar (0,6; 0,7 e 0,8%) e suplementado com 3% de sacarose e 0,1% de carvão ativado. Seu pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C por 20 minutos. Foram utilizados diferentes tipos de tampas para vedação (tampa sem PVC, tampa com PVC, somente PVC e tufos de algodão) (Tabela 2).

Tabela 2 Diferentes combinações das concentrações de ágar e tipo de vedação em tubos de ensaio para na maturação *in vitro* de embriões somáticos de murici-pequeno em WPM.

Tratamento	Geleificante (ágar)	Vedação
T1	0,6%	Tampa sem PVC
T2	0,7%	Tampa sem PVC
T3	0,8%	Tampa sem PVC
T4	0,6%	Tampa com PVC
T5	0,7%	Tampa com PVC
T6	0,8%	Tampa com PVC
T7	0,6%	Somente PVC
T8	0,7%	Somente PVC
T9	0,8%	Somente PVC
T10	0,6%	Tufos de algodão
T11	0,7%	Tufos de algodão
T12	0,8%	Tufos de algodão

Após a inoculação, os embriões foram mantidos por 30 dias em sala de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, na presença de luz com irradiância de $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas. Após este período, foram avaliados o número de plântulas formadas, número de plântulas normais e hiper-hídricas, formação de raiz, de calos embriogênicos e indução de embriões secundários.

2.6.3 Tipos de tampas para frascos e concentrações de ágar na maturação *in vitro* de embriões somáticos

Os embriões cordiformes e torpedos obtidos no item 2.3 foram inoculados em frascos contendo 30 mL em meio de cultura WPM, solidificado com diferentes concentrações de ágar (0,6; 0,7 e 0,8%) e suplementado com 3% de sacarose, 0,1% de carvão ativado e 28,87 μM de GA_3 . O meio teve o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C por 20 minutos. Foram utilizados dois tipos de tampas para vedação (convencional, convencional com membranas e Biosama[®]) (Tabela 3).

Tabela 3 Diferentes combinações das concentrações de ágar e formas de vedação em frascos na maturação *in vitro* de embriões somáticos de murici-pequeno em meio WPM.

Tratamento	Geleificante (ágar)	Vedação
T1	0,6%	Tampa sem PVC
T2	0,7%	Tampa sem PVC
T3	0,8%	Tampa sem PVC
T4	0,6%	Tampa com PVC
T5	0,7%	Tampa com PVC
T6	0,8%	Tampa com PVC
T7	0,6%	Tampa Biosama [®]
T8	0,7%	Tampa Biosama [®]
T9	0,8%	Tampa Biosama [®]

Após a inoculação, os embriões foram mantidos por 30 dias em sala de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, na presença de luz com irradiância de 43 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas. Após este período, foi avaliado o número

de plântulas formadas, número de plântulas normais e hiper-hídricas, formação de raiz e formação de calos embriogênicos e embriões somáticos secundários.

2.7 Análise estatística

O delineamento utilizado em todos os experimentos foi o inteiramente casualizado (DIC), com parcela experimental de 10 tubos de ensaio por tratamento para os itens 2.2.1, 2.2.2, 2.3, 2.4.1, 2.6.2; e 5 frascos por tratamento com 3 explantes por frasco para o item 2.3, 2.4.2, 2.5, 2.6.1 e 2.6.3. Os dados das variáveis foram analisados por meio de regressão polinomial para os itens 2.3, 2.4.1 e 2.4.2; e para os itens 2.5, 2.6.1, 2.6.2 e 2.6.3, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A análise de variância foi realizada utilizando-se o pacote estatístico SISVAR[®] (FERREIRA, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Indução de calos pró-embriogênicos

3.1.1 Fontes e concentrações de citocininas e ANA e altas concentrações de ANA

Durante a indução dos calos pró-embriogênicos não foi observada formação de calos embriogênicos e embriões somáticos independente do subcultivo e combinação dos reguladores utilizados.

Os calos pró-embriogênicos apresentaram estruturas friáveis, aspectos de oxidação e coloração amarronzada com algumas partes amareladas (Figura 1).

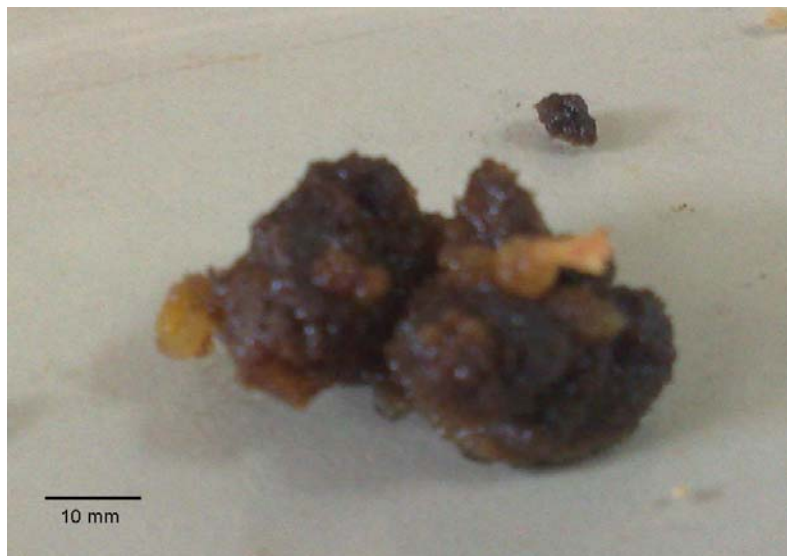


Figura 1 Calo pró-embriogênico de murici-pequeno após 30 dias em diferentes concentrações de diferentes citocininas e ANA em meio MS após 60 dias de cultivo.

Carvalho et al. (2004) observaram a formação de calos pró-embriogênicos em caquizeiro utilizando citocinina (cinetina) e auxina (2,4-D) corroborando os resultados encontrados no murici-pequeno.

3.2 Indução de calos embriogênicos e embriões somáticos

3.2.1 Influência de fontes e concentrações de citocininas e ANA

Não se verificou a formação de calos embriogênicos e embriões somáticos no primeiro subcultivo para nenhuma citocinina utilizada juntamente com a auxina ANA.

Para o segundo subcultivo, em que houve formação de calos embriogênicos, a interação foi significativa somente para concentração de CIN nas concentrações de 0 e 0,54 μM de ANA (Figura 2). A maior formação de calos embriogênicos foi encontrada na concentração de 0,54 μM de ANA. A maior formação de calos embriogênicos foi observada no ponto máximo (4,76 μM de CIN). Comportamento semelhante para formação de calos embriogênicos foi observado para a ausência de CIN, em que apresentou o mesmo ponto máximo (4,76 μM de CIN), mas alcançando valor inferior na formação de calos embriogênicos. Os valores alcançados pelos pontos máximos, respectivamente, foram 54,48 e 97,96%.

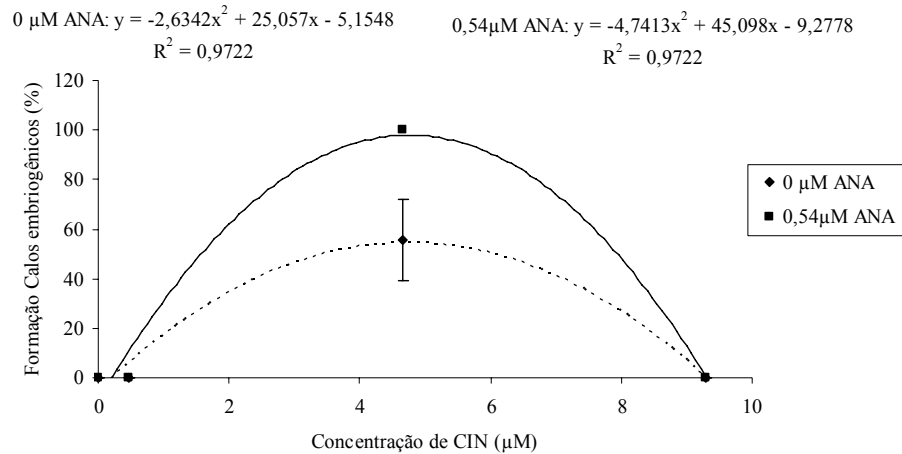


Figura 2 Formação de calos embriogênicos *in vitro* de murici-pequeno formados a partir de calos (2^o subcultivo) em diferentes concentrações de CIN e ANA após 60 dias de incubação em meio de cultura MS.

Para a formação de embriões somáticos no segundo subcultivo, somente foi significativo a interação entre concentrações de CIN e as concentrações de 0 e 0,54 μM de ANA, assim como para calos embriogênicos. Os resultados encontrados para embriões somáticos apresentaram os mesmo valores que o encontrado para calos embriogênicos, sendo seus pontos máximos e seus valores alcançados iguais aos encontrados para calos embriogênicos (Figura 3).

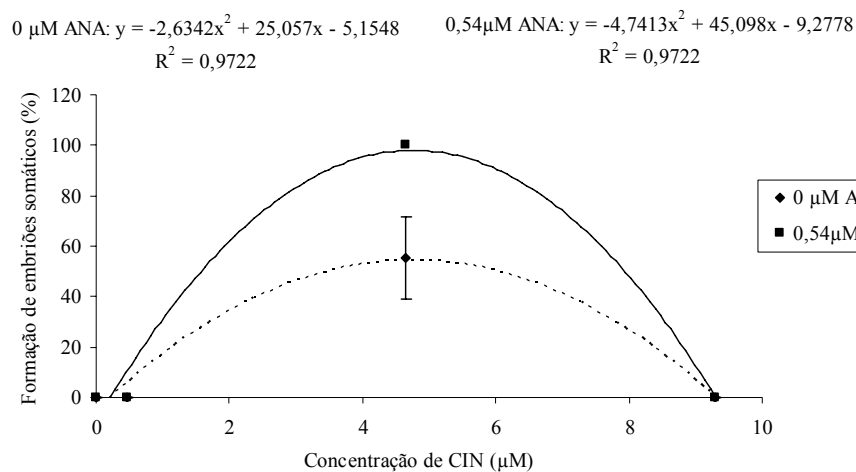


Figura 3 Formação de embriões somáticos *in vitro* de murici-pequeno formados a partir de calos (2^o subcultivo) em diferentes concentrações de CIN (Cinetina) e ANA após 60 dias de incubação em meio de cultura MS.

Para o terceiro subcultivo observou-se a interação entre concentrações de CIN e três concentrações de ANA (0; 0,54 e 10,74 μM) para formação de calos embriogênicos (Figura 4). A formação de calos embriogênicos nos demais tratamentos não foi constatada. Para as concentrações 0 e 0,54 μM de ANA, na formação de calos embriogênicos, a maior concentração de CIN apresentou a maior formação de calos embriogênicos (77,78 e 54,55 %, respectivamente). Já para a interação entre as concentrações de CIN e a concentração de 10,74 μM de ANA, a maior formação de calos embriogênicos foi constatada na concentração de 5,17 μM de CIN, que alcançou o valor de 99,13% de formação de calos embriogênicos.

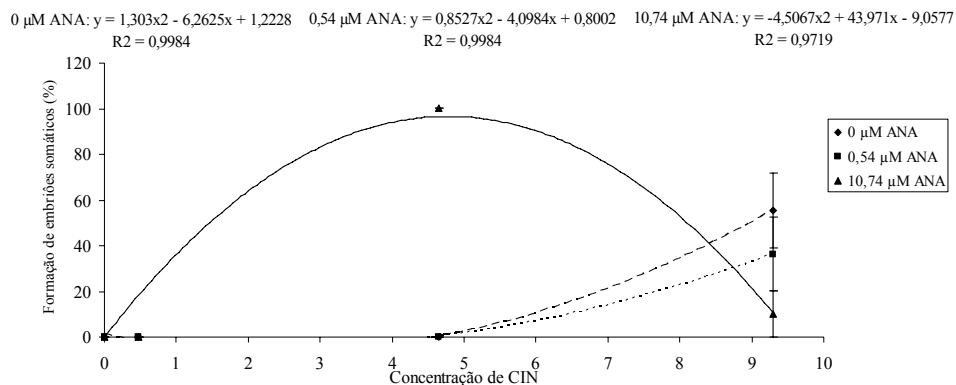


Figura 4 Formação de calos embriogênicos *in vitro* de murici-pequeno formados a partir de calos (3º subcultivo) em diferentes concentrações de CIN e ANA após 60 dias de incubação em meio de cultura MS.

Para a formação de embriões somáticos, somente as concentrações de 0; 0,54 e 10,74 μM de ANA interagindo com todas as concentrações de CIN foram significantes ao nível de 5% de probabilidade (Figura 5). As concentrações de 0 e 0,54 μM de ANA apresentaram maior formação de embriões somáticos na concentração de 9,29 μM de CIN (55,56 e 36,36 %, respectivamente). Para as concentrações de CIN e 10,74 μM de ANA, estas apresentaram mesmos resultados observados para formação de calos embriogênicos, alcançando também os mesmos valores.

$$0 \mu\text{M ANA: } y = 1,303x^2 - 6,2625x + 1,2228 \quad R^2 = 0,9984$$

$$0,54 \mu\text{M ANA: } y = 0,8527x^2 - 4,0984x + 0,8002 \quad R^2 = 0,9984$$

$$10,74 \mu\text{M ANA: } y = -4,5067x^2 + 43,971x - 9,0577 \quad R^2 = 0,9719$$

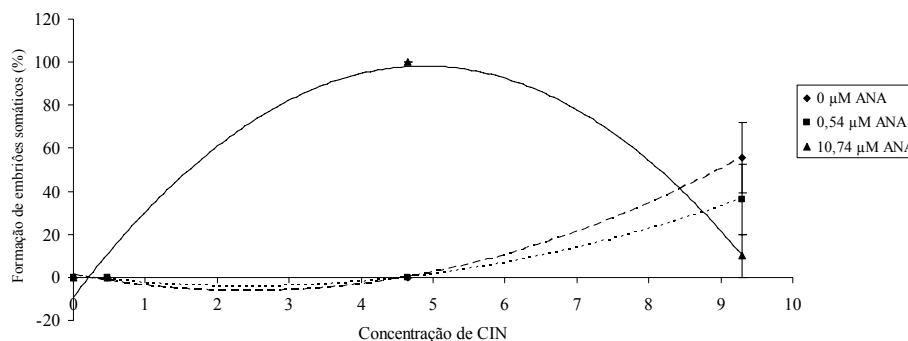


Figura 5 Formação de embriões somáticos *in vitro* de murici-pequeno formados a partir de calos (3º subcultivo) em diferentes concentrações de CIN e ANA, após 60 dias de incubação em meio de cultura MS.

Os resultados encontrados demonstraram que a utilização de Cinetina e ANA durante o processo de indução de calos pró-embriogênicos favoreceu o surgimento de calos embriogênicos e embriões somáticos.

Resultados semelhantes foram observados por Lenis-Manzano et al. (2010) que conseguiram induzir embriões somáticos de *Urochloa brizantha* utilizando combinação de Cinetina e ANA, mas não utilizando meio na ausência de regulador de crescimento para a indução dos embriões somáticos.

O uso das citocininas pode favorecer a produção de calo embriogênico (CHÉE; CANTLIFFE, 1988), mas, em algumas famílias, demonstraram não serem necessárias (AMMIRATO, 1977). Schenck e Hildebrandt (1972), entretanto, afirmaram que baixas concentrações de citocininas são necessárias para a embriogênese somática na maioria das culturas de células de dicotiledôneas. Em suspensão celular de soja, foi mostrado que a Cinetina teve ótimo efeito na formação de embriões somáticos (PHILLIPS; COLLIN, 1981).

Em geral, na maioria dos modelos de embriogênese induzida *in vitro*, as auxinas e entre elas a ANA, são consideradas as substâncias responsáveis pelo desencadeamento dos processos de dediferenciação (modelos indiretos),

alterando determinação e conferindo novas competências às células responsivas presentes nos explantes (TORRES; CALDAS; BUSO, 1999).

O efeito das auxinas no desenvolvimento de embriões somáticos é primariamente inibitório, e se manifesta nos estádios subsequentes ao globular. (HALPERIN; WETHERELL, 1964). Newcomb e Wetherell (1970) verificaram que, na presença da auxina 2,4-D, os embriões somáticos se desenvolviam até o estágio de pró-embrião. Desenvolvimento posterior para os estádios globular, cordiforme, maturo e plantas adultas só ocorria em meio desprovido de auxina.

A transferência das culturas embriogênicas para um meio sem reguladores de crescimento é normalmente necessária para a produção de embriões somáticos (SHARP et al., 1980) e essa transferência foi essencial para a formação de embriões somáticos no presente trabalho.

Os calos embriogênicos apresentaram aspectos bastante friáveis, com coloração branco amarelado, com pequenos pontos escuros podendo encontrar algumas partes avermelhadas, apresentavam também pequenas nodulações sendo possíveis isolamentos de embriões somáticos (Figura 6). Seu crescimento é rápido, sendo necessário a repicagem a cada 30 dias em meio MS sem adição de reguladores de crescimento.

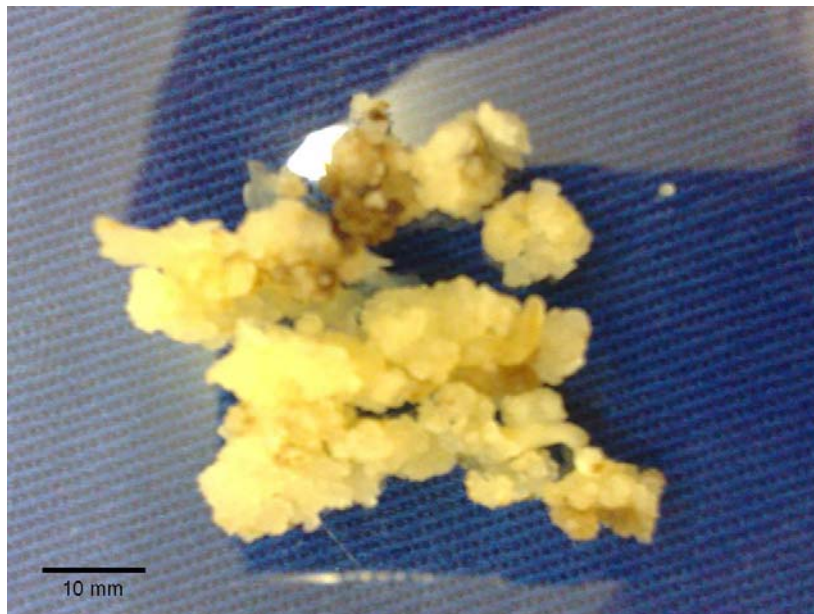


Figura 6 Calos embriogênicos de murici-pequeno obtidas em meio MS nas ausências de reguladores de crescimento após 60 dias na presença de luz.

Essas características também foram encontradas em outras espécies como aveia (*Avena sativa*) (LAMB; MILACH, 2001), *Pfaffia tuberosa* (FLORES et al., 2007), milho (*Zea mays*) (BEZERRA; WILLADINO; CAMARA, 2001) entre outros, com apenas pequenas diferenças na coloração, podendo ser de albino (branco) a amarelo.

Michoux-Ferriere, Grout e Carron (1992), trabalhando com *Hevea brasiliense*, afirmaram que nodulações presentes nos calos mostraram, através de posterior evolução, serem unidades embriogênicas, identificadas como pró-embriões globulares de origem multicelular.

Segundo Gray (1992), os embriões somáticos que se formam a partir de complexos pró-embriônicos tendem a se desenvolverem de forma assincrônica, sendo que, em determinado tempo, em vários estádios ontogenéticos.

Foram encontradas diferentes fases de embriogênese somática como embriões globulares [Figura 7 (A)], cordiformes e torpedos [Figura 7(B)] e cotiledonares [Figura 7(C)].

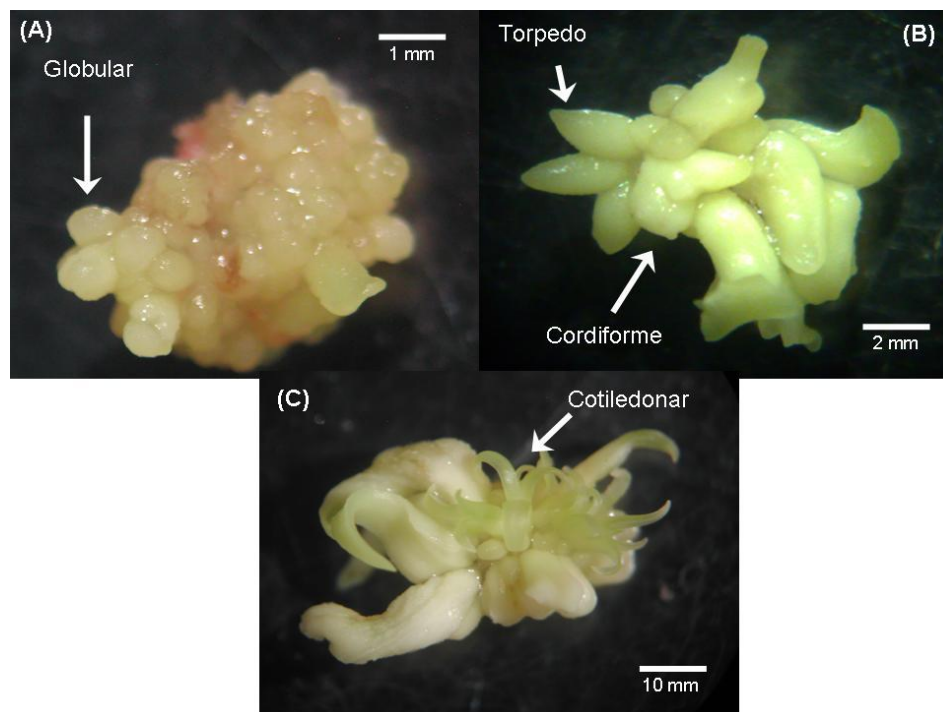


Figura 7 Embriões somáticos de murici-pequeno em diferentes etapas da embriogênese somática (A) Embriões somáticos globulares, (B) Embriões somáticos cordiformes e torpedos e (C) Embriões somáticos cotiledonares.

Nogueira et al. (2007), em análises ultraestrutural de calos embriogênicos de Murici-pequeno, encontraram maior formação de estruturas embriogênicas no terceiro subcultivo, corroborando os resultados encontrados no atual trabalho em que a formação de calos embriogênicos e embriões somáticos foi observada em maior número no terceiro subcultivo.

3.2.2 Efeito de altas concentrações de ANA na indução de embriões somáticos

Não se verificou a formação de calos embriogênicos e embriões somáticos tanto no primeiro quanto no segundo subcultivo para nenhuma concentração da auxina ANA utilizada, sendo observada a formação de calos embriogênicos e de embriões somáticos somente no terceiro subcultivo.

Para a indução de calos embriogênicos não foi observada diferença significativa para as concentrações de ANA utilizadas, obtendo média geral de 14% de formação de calos embriogênicos.

As altas concentrações de ANA foram significativas para a formação de embriões somáticos, que apresentaram maior percentagem (30%) na concentração de 537,06 μM de ANA (Figura 8). Já para a formação de calos embriogênicos as altas concentrações de ANA não foram significativas ao nível de 5% de probabilidade.

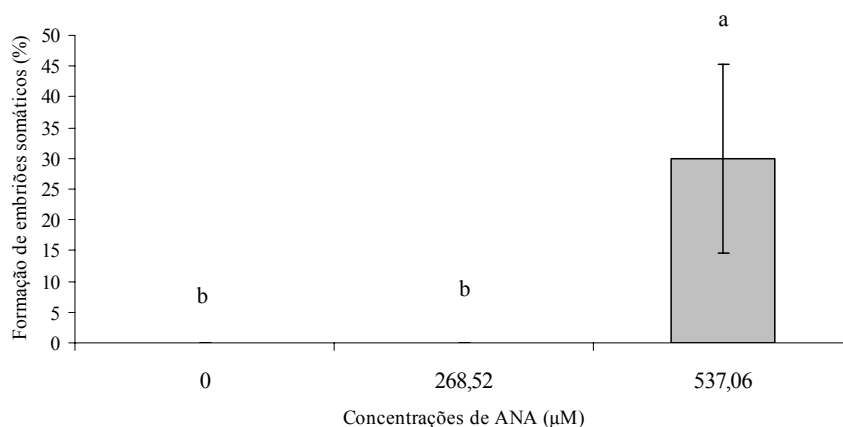


Figura 8 Formação de embriões somáticos de murici-pequeno obtidos *in vitro* (3^o subcultivo) a partir de altas concentrações de ANA, após 60 dias de incubação em meio de cultura MS. Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, em relação à concentração de ANA utilizada.

Desta forma, os resultados encontrados demonstram que a utilização de ANA favoreceu o surgimento de embriões somáticos (Figura 9), o que foi observado por Zimmerman (1993), de que ANA é uma das auxinas mais efetivas na indução de embriogênese somática.

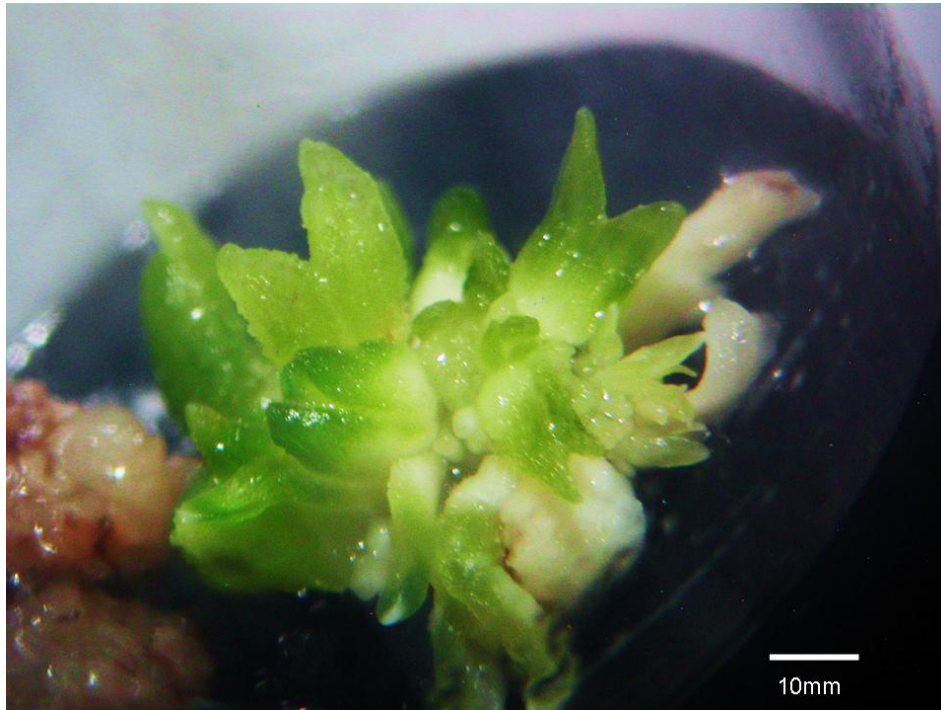


Figura 9 Embriões somáticos de murici-pequeno cultivadas *in vitro* em altas concentrações de ANA, após 60 dias de incubação em meio de cultura MS.

Flores et al. (2007) trabalhando com *Puffia tuberosa* verificaram o efeito positivo de ANA na indução de calos nodulares embriogênicos a partir de explantes radiculares.

As auxinas estão envolvidas com a indução e a iniciação de embriões somáticos. Tem sido sugerido que as auxinas são necessárias para a formação de agregados embriogênicos a partir de células individuais expressando a totipotência das células competentes (KOMAMINE et al., 1992). Em muitas espécies, o processo de iniciação verifica-se ao se cultivar o explante em meio com concentração relativamente elevada de Auxinas. O desenvolvimento subsequente dos embriões somáticos ocorre após transferência do calo ou suspensão celular para meio com baixa concentração de auxinas, ou desprovido

dessas (CHÉE; CANTLIFFE, 1988; HALPERIN; WETHERELL, 1964; REINOLD; MURASHIGE, 1979). Isto ocorre porque após a iniciação, as auxinas, inibem o desenvolvimento subsequente dos embriões (CALIGARI; SHOHET, 1993).

3.3 Maturação de embriões somáticos

3.3.1 Efeito do ácido giberélico (GA₃)

Para número médio de plântulas, o efeito do GA₃ foi significativo estatisticamente (Figura 10). O maior número médio de plântulas (0,70) foi encontrado na maior concentração de GA₃ (28,87μM).

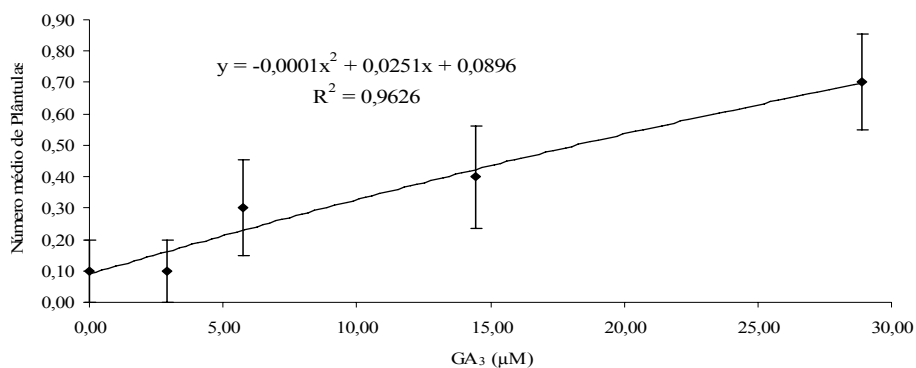


Figura 10 Número médio de plântulas de murici-pequeno obtidas *in vitro* a partir de embriões somáticos em diferentes concentrações de GA₃, após 60 dias de incubação em meio de cultura MS.

Para o número médio de plântulas normais, o acréscimo da concentração de GA₃ demonstrou o aumento da formação de plântulas normais, sendo encontrada a maior formação (0,50 plântulas) na mais alta concentração de GA₃ (28,87 μM) (Figura 11).

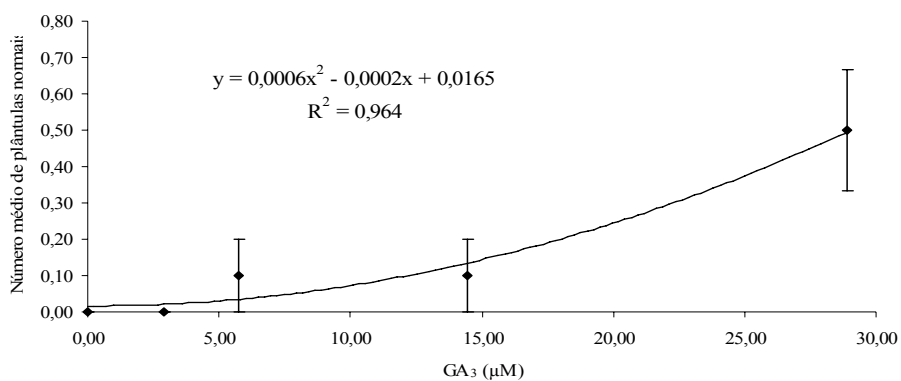


Figura 11 Número médio de plântulas normais de murici-pequeno obtidas *in vitro* a partir de embriões somáticos em diferentes concentrações de GA₃, após 60 dias de incubação em meio de cultura MS.

Não foi observada significância ao nível de 5% de probabilidade para o número médio de plântulas hiper-hídricas e para formação de raízes.

Para a formação de calos embriogênicos, a regressão foi significativa estatisticamente. Observou-se a diminuição da formação de calos embriogênicos com o aumento da concentração de GA₃ (Figura 12). A maior formação de calos embriogênicos foi observada na ausência de GA₃ onde houve 63,17% de formação de calos.

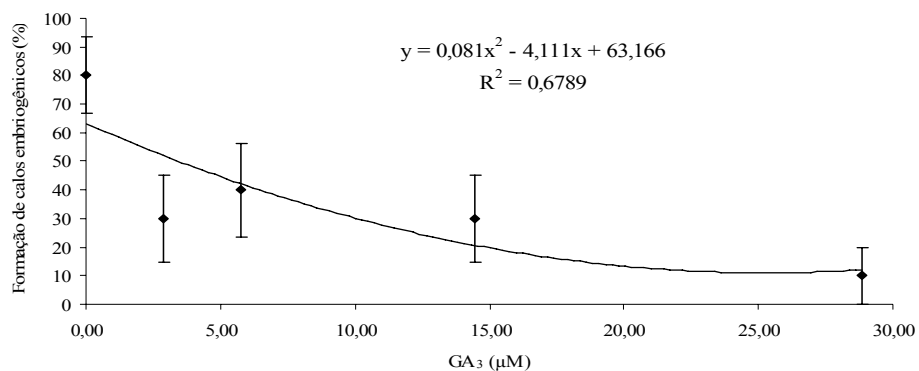


Figura 12 Formação de calos embriogênicos de murici-pequeno obtidas *in vitro* a partir de embriões somáticos em diferentes concentrações de GA₃, após 60 dias de incubação em meio de cultura MS.

A formação de embriões somáticos secundários apresentou uma diminuição com o aumento da concentração de GA₃ (Figura 13). A maior formação de embriões somáticos secundários (75,37%) foi encontrada na ausência de GA₃, semelhante à formação de calos embriogênicos.

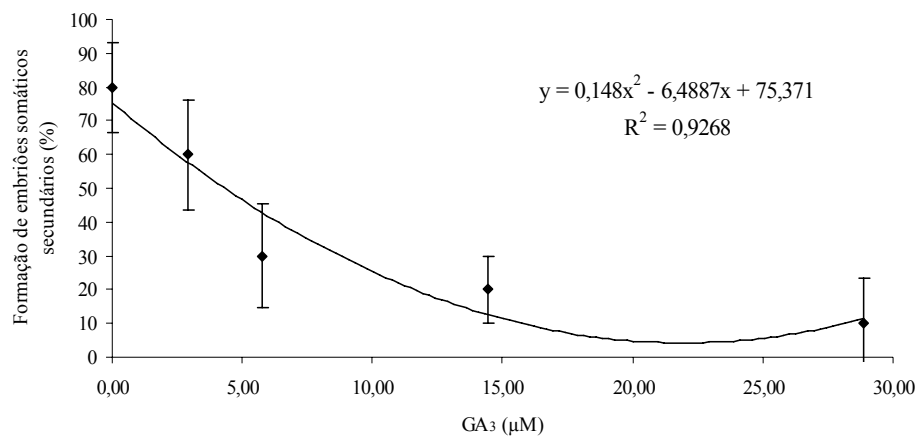


Figura 13 Formação de embriões somáticos secundários de murici-pequeno obtidos *in vitro* a partir de embriões somáticos em diferentes concentrações de GA₃, após 60 dias de incubação em meio de cultura MS.

A figura 14 ilustra o aspecto de plântulas normais de murici-pequeno oriundas de embriões somáticos na presença de GA₃.



Figura 14 Aspectos de plântulas normais de murici-pequeno oriundas de embriões somáticos cultivados *in vitro* após 60 dias de cultivo.

O regulador de crescimento GA_3 tem sido amplamente utilizado em diversas espécies com a finalidade de regeneração ou maturação de embriões somáticos *in vitro*, como é o caso da cultura da mandioca (MATSUMOTO et al., 1991; VAEZ, 2007), do mamoeiro (ALMEIDA; OLIVEIRA; DANTAS, 2000; WINNAAR, 1988), do cafeeiro (PEREIRA et al., 2007), dentre outras.

Como citado acima, na ausência de GA_3 a formação de calos embriogênicos e embriões secundários foi favorecida e a adição deste regulador provocou uma diminuição na formação destes. Estes dados concordam com os resultados de Almeida, Oliveira e Dantas (2000), que trabalhando com embriões somáticos de mamoeiro concluíram que o uso de GA_3 proporcionou maior crescimento das plântulas e menor formação de calos na base.

Ainda não está clara a função de GA_3 no crescimento de embriões *in vitro*, porém Quatrano (1987) afirma que o GA é sintetizado no tecido suspensor durante o seu estágio inicial do desenvolvimento de embriões zigóticos. O mesmo autor afirma que a concentração de GA fornecida pelo tecido suspensor

ao embrião zigótico é crítica para o desenvolvimento do estado inicial dos embriões e que o tecido suspensor pode ser substituído pelo GA exógeno para o suporte do desenvolvimento dos embriões zigóticos isolados em cultivo.

Matsumoto et al. (1991) sugerem que o mesmo mecanismo de ação do GA no embrião zigótico tenha acontecido nos embriões somáticos induzidos *in vitro*, favorecendo o desenvolvimento dos embriões somáticos.

3.3.2 Efeito do ácido abscísico (ABA)

Com o aumento da concentração de ABA, o número médio de plântulas apresentou formação no ponto máximo em 2,79 μM de ABA (Figura 15). Quando concentrações maiores foram utilizadas, observou-se que o número médio de plântulas reduziu.

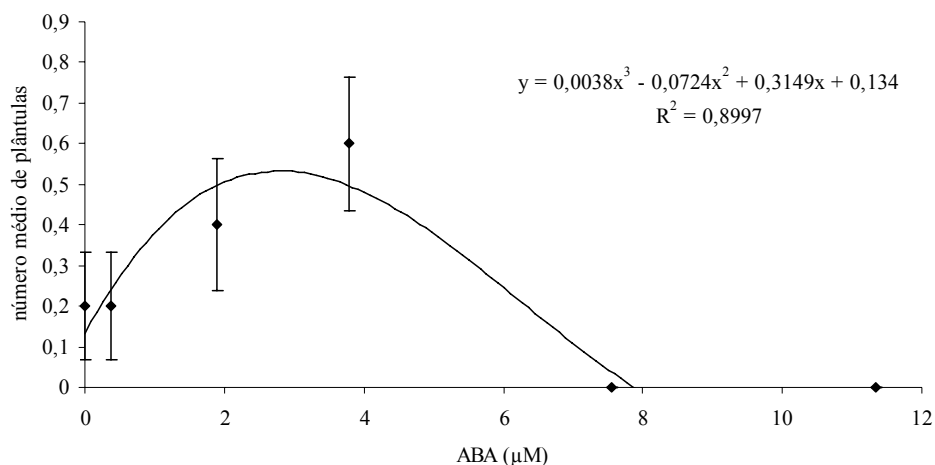


Figura 15 Número médio de plântulas de murici-pequeno obtidas *in vitro* a partir de embriões somáticos em diferentes concentrações de ABA, após 60 dias de incubação em meio de cultura MS.

As diferentes concentrações de ABA utilizadas no presente trabalho não diferiram estatisticamente para a variável número médio de plântulas normais e hiper-hídricas.

Esses resultados demonstraram que apesar de não ter havido diferença estatística entre plântulas normais e hiper-hídricas, o número médio de plântulas formadas foi de 0,37 plântulas na concentração de 3,83 μM de ABA.

A formação de raiz apresentou um aumento até a concentração de 5,00 μM de ABA, alcançando valor máximo de 57,51% de formação de raiz (Figura 16). Valores acima desta concentração apresentaram uma redução na formação de raiz até a concentração de 11,34 μM de ABA, em que não se observou rizogênese.

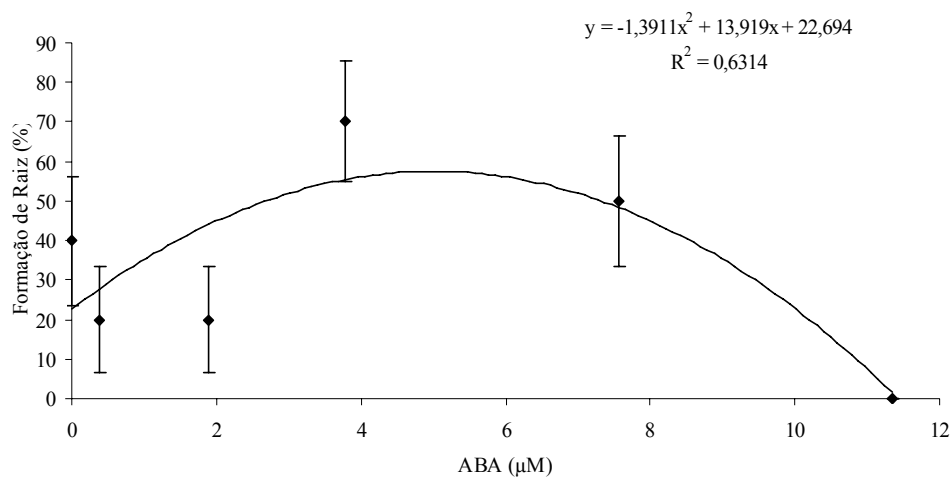


Figura 16 Formação de raiz de plântulas de murici-pequeno obtidas *in vitro* a partir de embriões somáticos em diferentes concentrações de ABA, após 60 dias de incubação em meio de cultura MS.

Foi encontrada maior formação de calos (71,79%) no tratamento controle (ausência de ABA) (Figura 17). Com o aumento das concentrações de

ABA, observou-se uma redução na formação de calos até o ponto mínimo de 7,99 μM .

Esses resultados demonstraram que o uso de ABA causou toxidez ou inibição da calogênese de murici-pequeno *in vitro*.

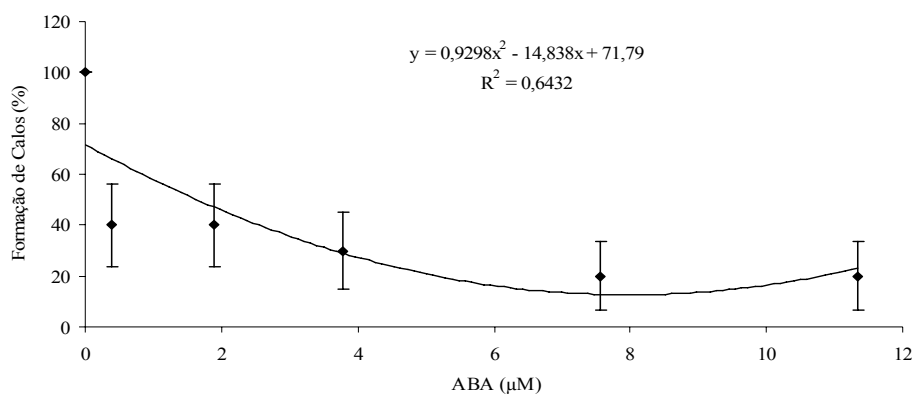


Figura 17 Formação de calos de murici-pequeno obtidos *in vitro* a partir de embriões somáticos em diferentes concentrações de ABA, após 60 dias de incubação em meio de cultura MS.

Para formação de embriões somáticos secundários, os resultados apresentaram uma redução de seu valor, sendo a maior formação de embriões somáticos secundários na ausência de ABA (Figura 18).

A redução na indução de embriões somáticos secundários demonstrou uma ineficiência do ABA na indução destes.

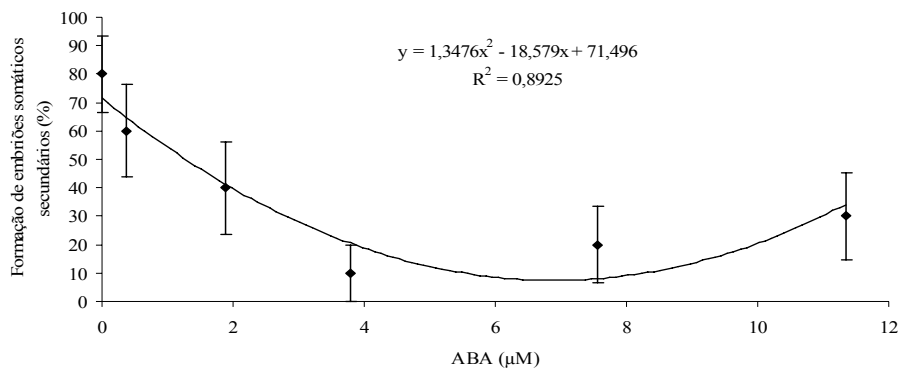


Figura 18 Formação de embriões somáticos secundários de murici-pequeno obtidos *in vitro* a partir de embriões somáticos em diferentes concentrações de ABA, após 60 dias de incubação em meio de cultura MS.

Steiner (2009) demonstrou a necessidade do uso de ABA na maturação de embriões somáticos de araucária. O autor observou maior formação de plântulas, oriundas de embriões somáticos, utilizando 150 µM de ABA. Os resultados obtidos no presente trabalho também demonstraram a necessidade de utilização deste regulador para a maturação de embriões somáticos, porém em concentrações muito menores (3,83 µM para formação de plântulas e 5,00 µM para rizogênese).

Segundo Ammirato (1977), o uso de ABA pode favorecer o crescimento, desenvolvimento e produção de embriões somáticos normais, evitando a germinação precoce dos mesmos.

A inclusão de ABA também aumenta a frequência de embriões somáticos produzidos e sua conversão em plantas (ZHENG et al., 1993).

O ABA exerce efeito notável na fase de maturação, podendo impedir processos de clivagem e gemação que são a expressão morfogênética dos ciclos repetitivos de divisão e dos estágios iniciais da diferenciação e que são conceituadas como embriogênese secundária (GUERRA et al., 1993).

Fujimura e Komamine (1975) observaram que o número total de embriões somáticos em desenvolvimento decrescia com o aumento da concentração de ácido abscísico no meio. Isso pode explicar a diminuição da formação de embriões somáticos secundários encontrados para o murici-pequeno.

3.3.3 Indução de embriões somáticos secundários

Nos estudos para a indução de embriões somáticos secundários, os resultados encontrados demonstraram que para massa de embriões somáticos secundários utilizando tampas convencionais a melhor concentração de GA₃ foi 8,66 μM, com cerca de 2,27 g, já para tampas Biosama[®] a concentração de 2,88 μM GA₃ apresentou melhor resultado com média de 2,97 g. O uso de membranas não diferenciou entre si apresentando médias muito baixas em comparação com os demais tipos de vedação (Figura 19).

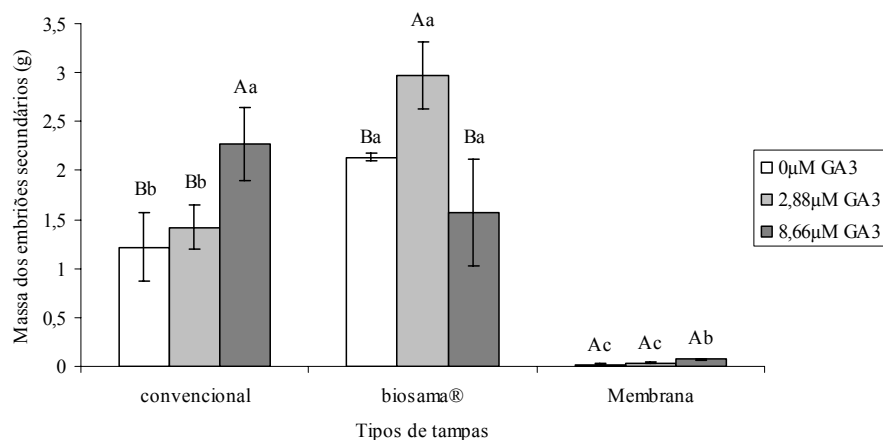


Figura 19 Médias da massa de embriões somáticos secundários de murici-pequeno obtidos *in vitro* a partir de embriões somáticos em diferentes concentrações de GA₃ e tipos de vedação. Médias seguidas de mesma letra maiúscula, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, em relação ao tipo de vedação. Médias seguidas de mesma letra minúscula, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, em relação à concentração de GA₃ utilizada.

Para número de embriões somáticos secundários foram encontrados resultados semelhantes à massa dos embriões secundários, que, para o uso de tampas convencionais à concentração de 8,66 μM apresentou maior número de embriões somáticos (909,1 embriões) e à concentração de 2,88 μM de GA₃ em tampa Biosama® apresentou maior número de embriões secundários (1188,1 embriões), já para o uso das membranas o número de embriões foi muito baixo (média de 10,47 embriões), isso se deve principalmente pela rápida evaporação do meio de cultura, não permitindo assim o desenvolvimento dos embriões secundários (Figura 20).

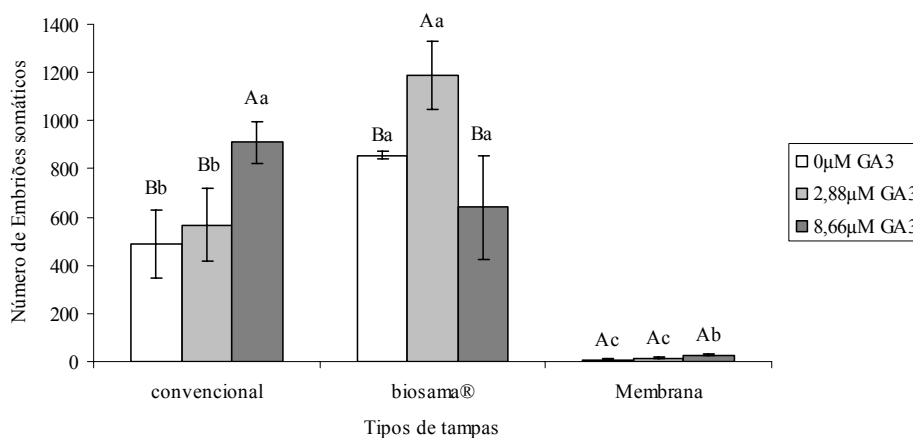


Figura 20 Número médio de embriões somáticos secundários de murici-pequeno obtidos *in vitro* a partir de embriões somáticos em diferentes concentrações de GA₃ e tipos de vedação. Médias seguidas de mesma letra maiúscula, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, em relação ao tipo de vedação. Médias seguidas de mesma letra minúscula, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, em relação à concentração de GA₃ utilizada.

Conhece-se muito pouco acerca da iniciação e desenvolvimento da embriogênese somática secundária e três diferentes hipóteses foram sugeridas por Hakman e Arnold (1988) para explicar a origem deste processo: 1) embriões somáticos podem se originar de células simples ou pequenos agregados celulares por uma divisão inicial assimétrica que delimita a região apical embrionária da região do suspensor; 2) embriões somáticos podem se desenvolver a partir de células meristemáticas da região do suspensor, sendo que as iniciais podem se originar por divisão assimétrica; 3) embriões somáticos podem se originar por um mecanismo similar à embriogênese somática secundária por clivagem, com a separação inicial, ocorrendo na região do ápice embrionário.

Existem poucos estudos sobre quais constituintes do meio de cultura podem ser considerados essenciais para a indução e manutenção de embriões somáticos secundários.

Matsumoto et al. (1991), trabalhando com embriões somáticos de mandioca, verificou que o número dos embriões somáticos aumentou quando o meio de cultivo foi suplementado com GA_3 , o que sugere que o ácido giberélico tem importante função na indução de embriões somáticos.

O aspecto da indução de embriões somáticos secundários utilizando os diferentes tipos de vedação pode ser observado na Figura 21. Essa observação corrobora os resultados observados acima, em que o uso de membranas apresentou resultados baixos, provavelmente devido à rápida evaporação do meio de cultura. O uso de tampas biosama[®] apresentou os melhores resultados, isso se deve a trocas gasosas e a perda de água para o meio externo que sua válvula possibilita.

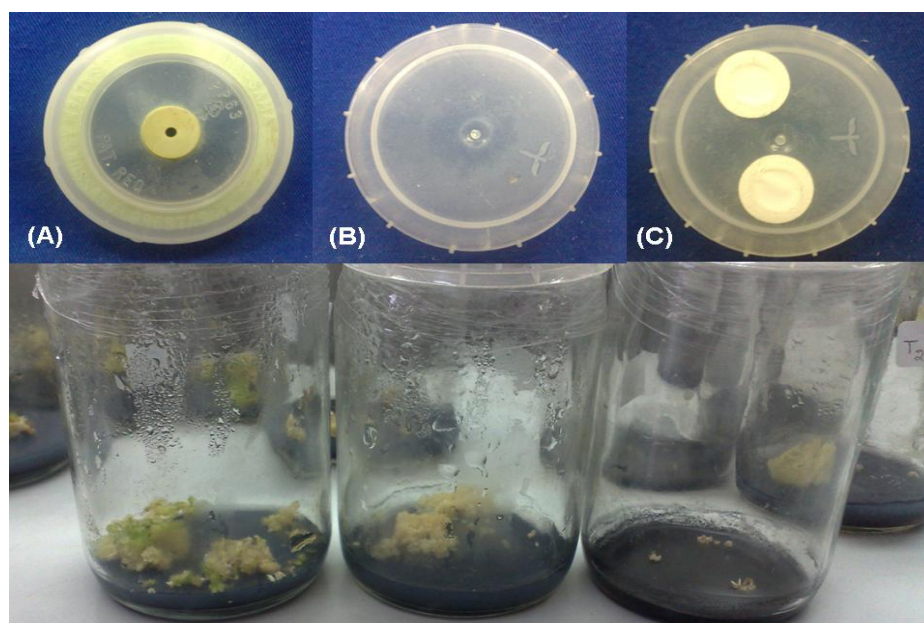


Figura 21 Embriões somáticos secundários de murici-pequeno obtidos *in vitro* a partir de embriões somáticos em meio MS, com diferentes concentrações de GA_3 em diferentes tipos de vedação. (A) tampa Biosama[®], (B) tampa convencional e (C) tampa convencional com membrana, após 60 dias cultivo.

No cultivo *in vitro* de *Herreria salsaparilha*, o uso de vedação com filtros facilitou a perda de água do sistema e permitiu que, nos frascos, tivesse mesma concentração de oxigênio que as do ambiente externo (GONÇALVES, 2004).

Lai et al. (1998) demonstraram que, em brotos de mamoeiro, o uso de tampas com membranas facilitadoras de trocas gasosas, resultou em melhores rendimentos e qualidade.

3.4 Controle da hiper-hidricidade na embriogênese somática de murici-pequeno

3.4.1 Uso de diferentes concentrações de sacarose e meios de cultura

Para número de plântulas formadas, somente os meios de cultura apresentaram diferença significativa.

Os resultados demonstraram que o uso do meio de cultura WPM apresentou maior número médio de plântulas (Figura 22). O valor médio encontrado no meio de cultura WPM foi 3,2 vezes maior (0,867 plântulas) que o obtido no meio de cultura MS (0,267 plântulas).

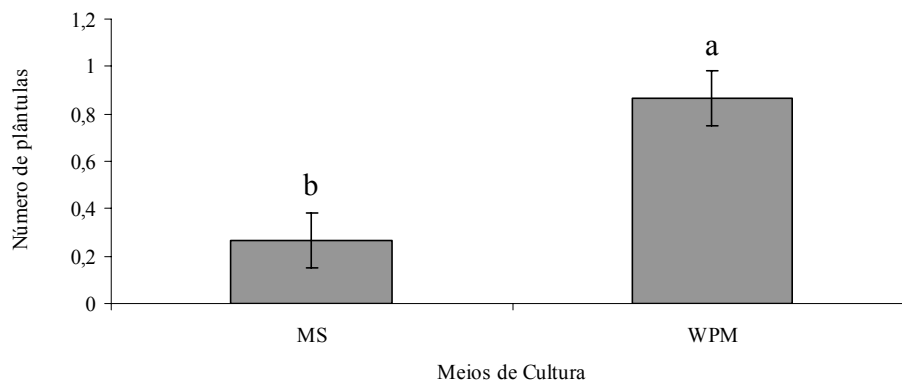


Figura 22 Número médio de plântulas de murici-pequeno *in vitro* formadas a partir de embriões somáticos em diferentes meios de cultura, após 60 dias de incubação. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, em relação ao meio de cultura.

Apesar de não ter encontrado diferença significativa nas diferentes concentrações de sacarose utilizadas no atual trabalho, para indução de plântulas, alguns autores (BERTONI et al., 2006; ERIG; SCHUCH, 2005) afirmam que o aumento da concentração de sacarose provoca um aumento da hiper-hidricidade.

O número de plântulas normais, assim como o número para plântulas formadas, apresentaram resultados significativos somente para os meios de cultura utilizados.

Concordando com os resultados encontrados para número de plântulas formadas, o meio de cultura WPM apresentou maior formação de plântulas normais. O meio WPM apresentou formação média de 0,26 plântulas normais enquanto que em meio MS não houve formação de plântulas normais (Figura 23).

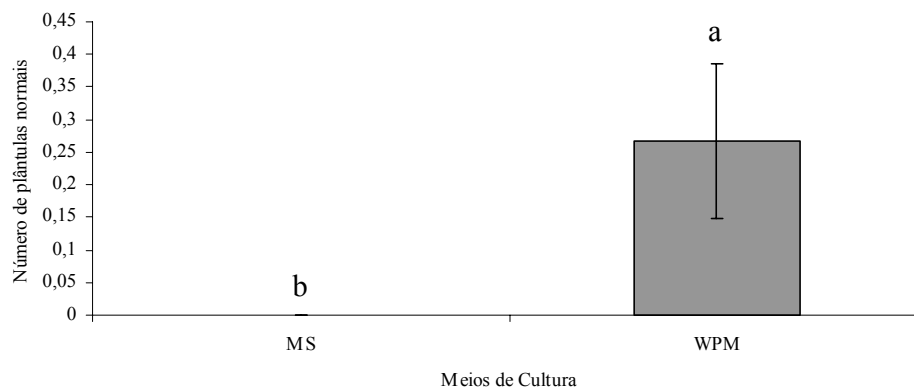


Figura 23 Número médio de plântulas normais de murici-pequeno *in vitro* formadas a partir de embriões somáticos em diferentes meios de cultura, após 60 dias de incubação. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, em relação ao tipo de meio de cultura.

Segundo Augusto (2001), plantas *in vitro* de amoreira-preta cultivadas nos meios de cultura MS e MS/2, manifestaram sinais de hiper-hidricidade. O contrário foi observado para o meio WPM. Este fenômeno pode ser explicado pela alta concentração de amônio no meio de cultura MS, corroborando os resultados encontrados no presente trabalho onde maior número de plântulas normais foi encontrado em meio WPM. Os aspectos das plântulas normais obtidas em meio WPM podem ser observados na Figura 24.



Figura 24 Plântulas normais de murici-pequeno *in vitro* formadas a partir de embriões somáticos em meio de cultura WPM.

Fortes (1991) sugere que uma baixa relação C/N pode levar a um aumento da hiper-hidricidade dos brotos.

Segundo Grattapaglia e Machado (1998), a redução da concentração da fonte de nitrogênio na forma amoniacal tem sido utilizada para reduzir a hiper-hidricidade.

Discordando com os resultados encontrados no presente trabalho e com os demais autores, Gray e Benton (1990) observaram que o efeito do meio WPM sobre o desenvolvimento de meristemas apicais de *Vitis rotundifolia* foi negativo. Esses autores observaram menor número de brotações, sintomas de hiper-hidricidade e brotos com abscisão foliar.

Para o número de plântulas hiper-hídricas, somente as concentrações de sacarose, isoladamente, apresentaram resultados significativos estatisticamente.

Esses resultados demonstraram que, na concentração de 3,0% de sacarose houve uma alta formação de número de plântulas hiper-hídricas (0,80 plântulas) em comparação com as outras concentrações de sacarose (0,10 plântulas) (Figura 25).

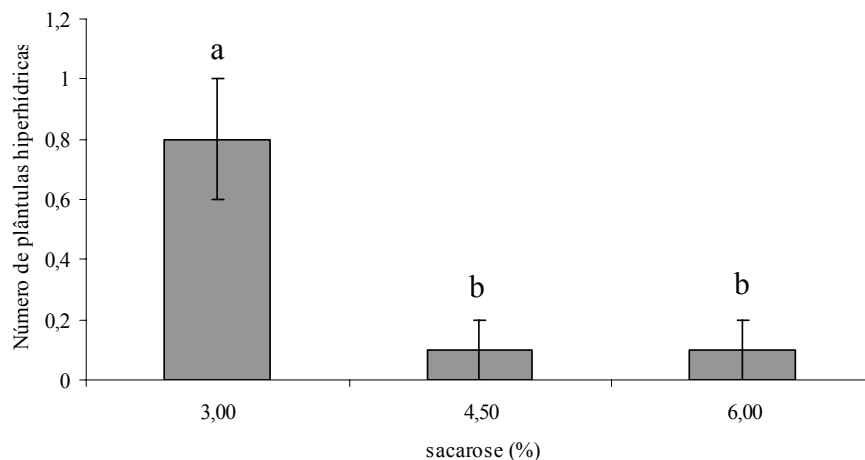


Figura 25 Número médio de plântulas hiper-hídricas de murici-pequeno *in vitro* formadas a partir de embriões somáticos em diferentes concentrações de sacarose, após 60 dias de incubação. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, em relação à concentração de sacarose utilizada.

Como para número de plântulas hiper-hídricas e para a formação de raiz, somente a variável concentração de sacarose foi significativa ao nível de 5% de probabilidade.

Observou-se maior formação de raiz (70%) na menor concentração de sacarose (3%) (Figura 26).

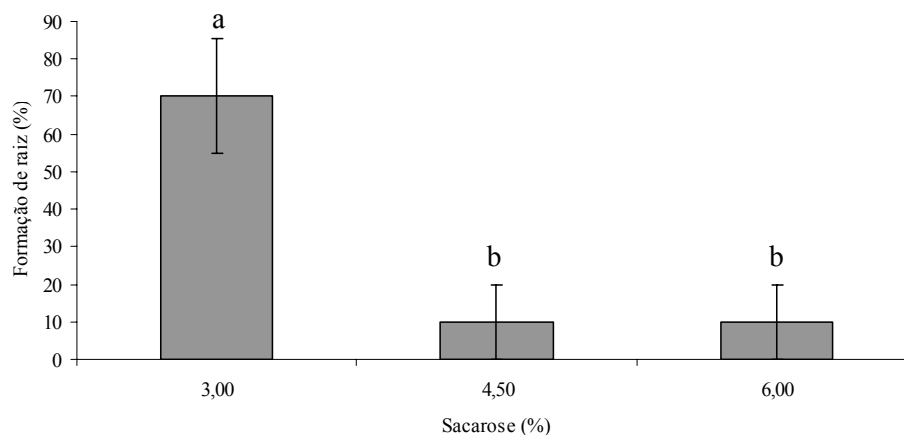


Figura 26 Formação de raiz de plântulas de murici-pequeno *in vitro* formadas a partir de embriões somáticos em diferentes concentrações de sacarose, após 60 dias de incubação. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, em relação à concentração de sacarose utilizada.

3.4.2 Tipos de vedação para tubos de ensaio e concentrações de ágar na maturação *in vitro* de embriões somáticos

Não foi observada significância na interação entre concentração de ágar e tipos de vedação para número de plântulas. Foi observada significância somente nas variáveis separadamente.

Os resultados encontrados para formação de plântulas demonstraram que para tipos de vedação o maior resultado foi encontrado na utilização de tampa comum sem PVC, que apresentou a formação média de 1 (uma) plântula e sendo o menor resultado encontrado utilizando como vedação tufos de algodão, onde não se observou a formação de plântulas (Figura 27).

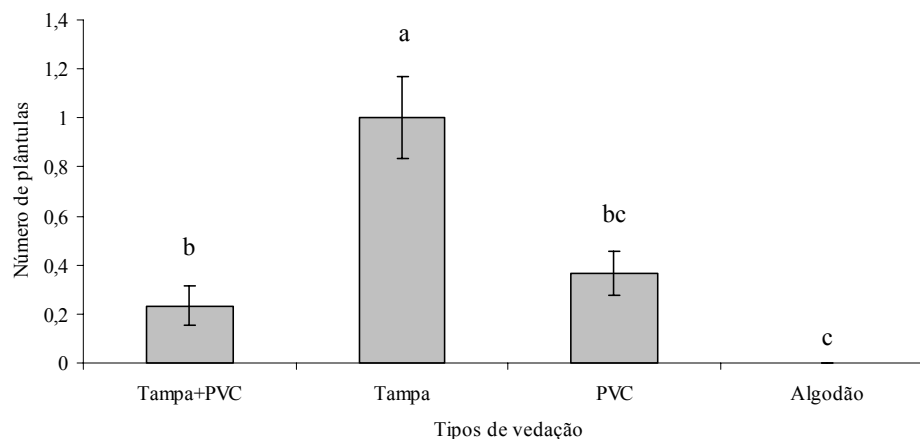


Figura 27 Número médio de plântulas de murici-pequeno obtidas *in vitro* a partir de embriões somáticos em diferentes tipos de vedações, após 60 dias de incubação. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, em relação aos tipos de vedação utilizada.

O uso de tampa comum sem PVC apresentou melhor resultados por permitir uma maior troca gasosa com o meio externo, diminuindo assim a umidade interna do tubo e, conseqüentemente, diminuindo a hiper-hidricidade.

A não formação de plântulas com o uso de tufos de algodão deve-se à rápida evaporação do meio de cultura no tubo de ensaio.

Nas concentrações de ágar, o melhor resultado, para número de plântulas, foi encontrado na concentração de 0,8% de ágar, que apresentou formação média de 0,625 plântulas (Figura 28).

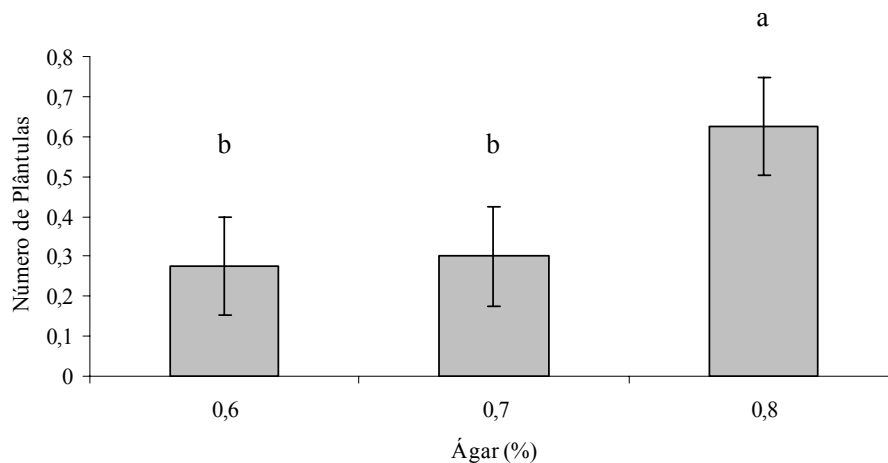


Figura 28 Número médio de plântulas de murici-pequeno obtidas *in vitro* a partir de embriões somáticos em diferentes concentrações de ágar, após 60 dias de incubação. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, em relação às concentrações de ágar utilizada.

Para número de plântulas normais, verificou-se a interação entre a concentração de ágar e tipos de vedação, demonstrando que ao se utilizar tampa com PVC e tufos de algodão não se observou plântulas normais, independente da concentrações de ágar utilizada. Para tampas sem PVC o uso da concentração de 0,8% de ágar apresentou o melhor resultado. Para uso somente de PVC o uso da concentração de 0,8% obteve maior formação de número de plântulas normais, mas inferior ao uso de tampa sem PVC na mesma concentração de ágar (Figura 29).

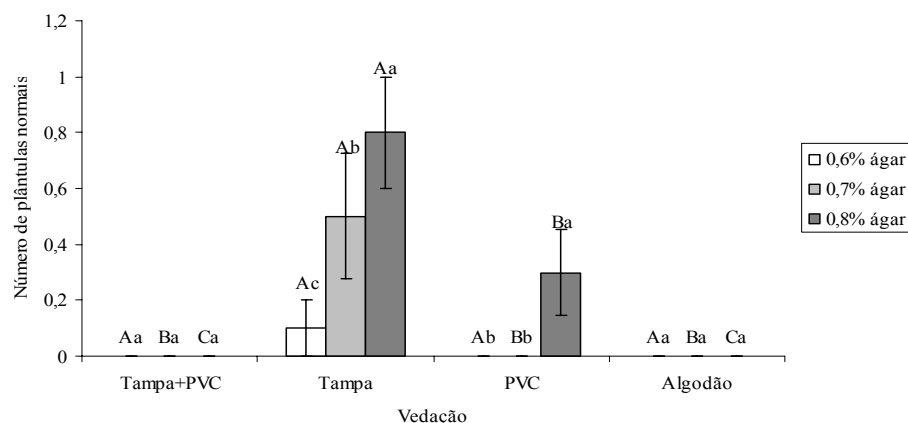


Figura 29 Número médio de plântulas normais de murici-pequeno obtidas *in vitro* a partir de embriões somáticos em diferentes concentrações de ágar com diferentes vedações. Médias seguidas de mesma letra minúscula, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, em relação ao tipo de vedação. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, em relação à concentração de ágar utilizada.

O uso de algodão como forma de vedação, como apresentado para número de plântulas, pode ter causado uma rápida evaporação do meio, impedindo assim, o desenvolvimento das plântulas e para o uso de tampa com PVC não houve formação de plântulas normais devido à dificuldade de trocas gasosas, o que elevou a umidade no interior do tubo, aumentando assim a hiper-hidricidade.

Para Bornman e Vogelmann (1984), a hiper-hidricidade está inversamente correlacionada com a concentração do ágar, sugerindo que o estado fisiológico do meio de cultura pode afetar a difusão de nutrientes e dos reguladores de crescimento nos tecidos em cultivo.

Já os resultados para número de plântulas hiper-hídricas demonstraram que para tampa com PVC, o maior número de plântulas hiper-hídricas foi encontrado com o uso de 0,8% de ágar. Para a vedação somente com a tampa

não foi observada diferença estatística entre as concentrações de ágar. Para o uso de PVC o maior número de plântulas hiper-hídricas foi encontrado na concentração de 0,8% de ágar. E para algodão não apresentou formação de plântulas hiper-hídricas (Figura 30).

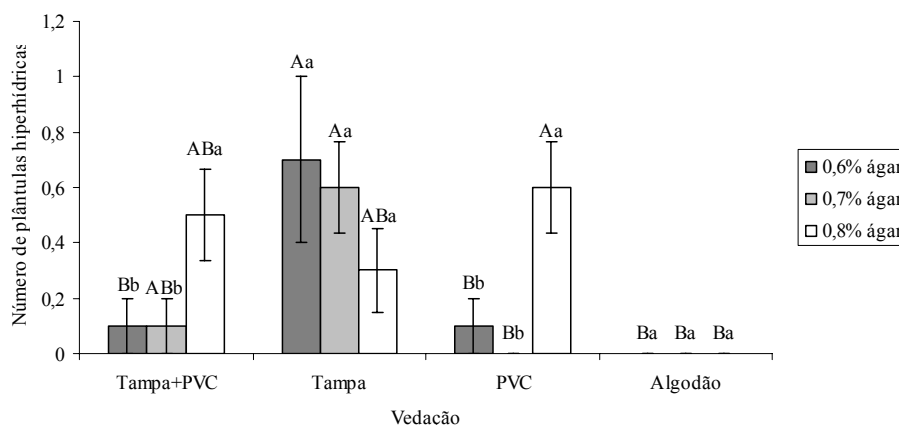


Figura 30 Número médio de plântulas hiper-hídricas de murici-pequeno obtidas *in vitro* a partir de embriões somáticos em diferentes concentrações de ágar com diferentes vedações. Médias seguidas de mesma letra minúscula, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, em relação ao tipo de vedação. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, em relação à concentração de ágar utilizada.

Os resultados demonstram que o uso de alta concentração de agar (0,8%) e tampa sem PVC apresentaram maior número de plântulas, plântulas normais para formação de plântulas a partir de embriões somáticos de murici-pequeno.

Mills, Yanqing e Benzioni (2004), trabalhando com propagação de jojoba, compararam propágulos crescidos em condições com ventilação restrita e com propágulos ventilados. Os autores observaram que, em condições

ventiladas, os propágulos tornaram-se menos propensos à hiper-hidricidade, apresentando maior resistência à perda de água.

No presente trabalho, o uso de baixa concentração de ágar apresentou maior formação de plântulas hiper-hídricas, e segundo Han, Paek e Choi (1991) a concentração de ágar está relacionada à hiper-hidricidade.

A Figura 31 mostra o aspecto de plântulas hiper-hídricas de murici-pequeno.

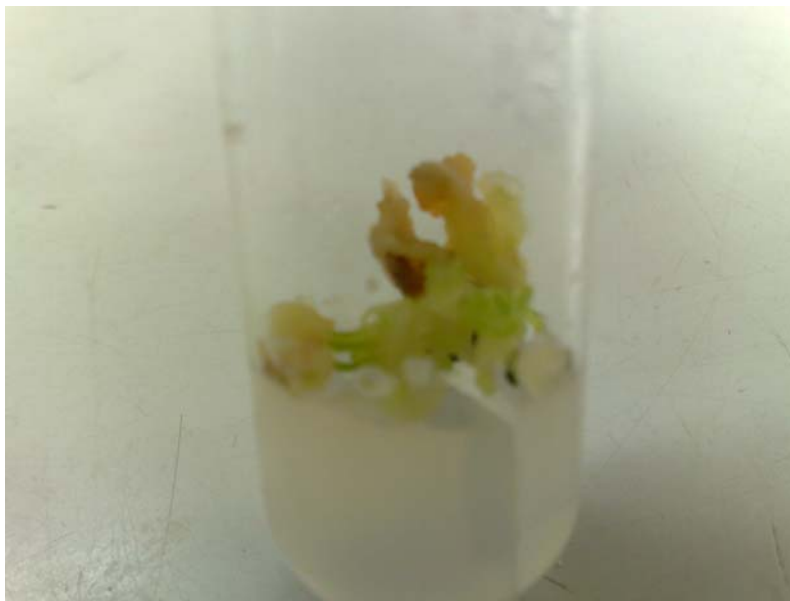


Figura 31 Plântula hiper-hídrica de murici-pequeno oriunda de embrião somático.

Para a formação de raiz a interação entre o tipo de vedação e as concentrações de ágar foi significativa estatisticamente. Para o uso de tampa com PVC e sem PVC não foi observada diferença entre as concentrações de ágar, já para o uso somente de PVC a concentração de 0,8% de ágar apresentou a maior formação de raiz, cerca de 80% de rizogênese. Para vedação com tufos

de algodão não foi formada raízes e, como nas demais variáveis, isso se deve à rápida evaporação do meio de cultura (Figura 32).

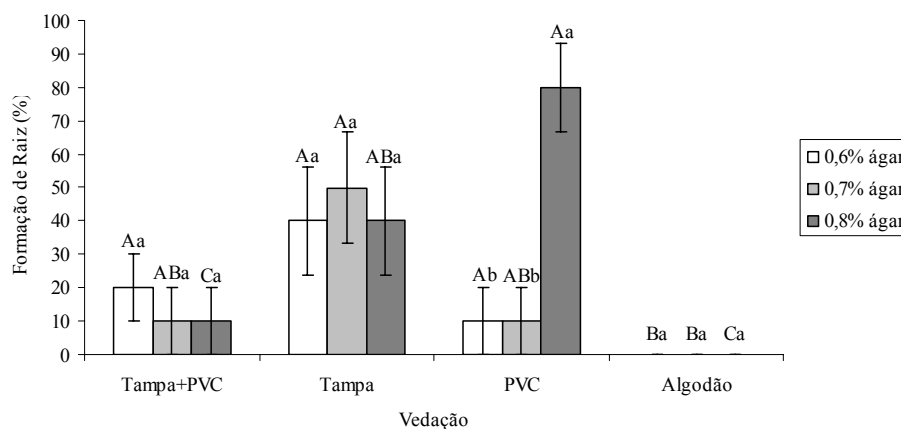


Figura 32 Formação de raízes em plântulas de murici-pequeno *in vitro* obtidas a partir de embriões somáticos em diferentes tipos de vedação e concentrações de ágar. Médias seguidas de mesma letra minúscula, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, em relação ao tipo de vedação. Médias seguidas de mesma letra maiúscula, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, em relação à concentração de ágar utilizada.

Santos (2007), trabalhando com cultivo *in vitro* de videira, observou que plântulas apresentaram maior sistema radicular utilizando vedação que permite trocas gasosas. Esses resultados concordam com os resultados encontrados no presente trabalho onde ocorreu maior formação do sistema radicular em vedações que permitem trocas gasosas. A Figura 33 mostra o aspecto da formação de raízes em plântulas de murici-pequeno.



Figura 33 Sistema radicular de plântulas *in vitro* de murici-pequeno, oriundas de embriões somáticos, cultivadas em tubos com tampas sem PVC.

Para a formação de calos, somente a utilização de algodão como forma de vedação diferiu dos demais resultados. Para uso de algodão não foi observada a presença de calos (Figura 34). Os demais resultados não diferiram entre si.

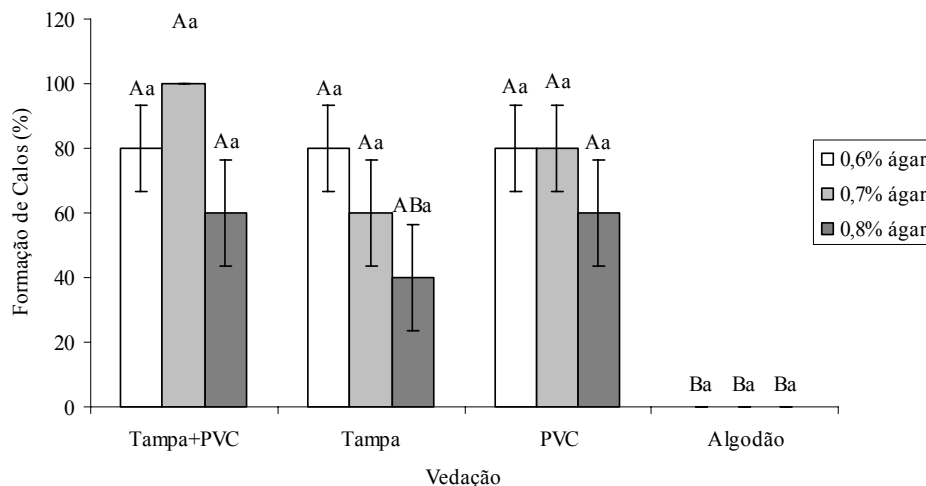


Figura 34 Presença de calos de murici-pequeno *in vitro* obtidos a partir de embriões somáticos em diferentes concentrações de ágar e tipos de vedação. Médias seguidas de mesma letra minúscula, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, em relação ao tipo de vedação. Médias seguidas de mesma letra maiúscula, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, em relação à concentração de ágar utilizada.

Para a formação de embriões secundários, a interação entre tipo de vedação e concentração de ágar não foi significativa. Somente a vedação, separadamente, foi estatisticamente significativa. O uso de algodão apresentou resultado inferior aos demais tratamentos, sendo ausente a presença de embriões secundários (Figura 35).

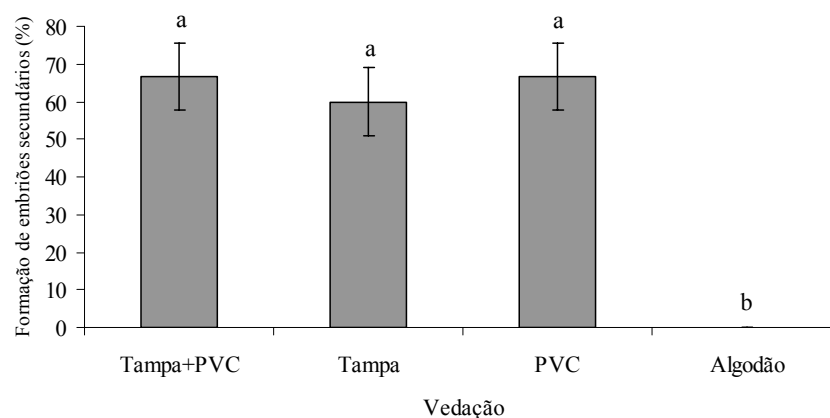


Figura 35 Formação de embriões somáticos secundários de murici-pequeno *in vitro* obtidos a partir de embriões somáticos com diferentes tipos de vedação, após 60 dias de incubação em meio WPM. Médias seguidas de mesma letra minúscula, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, em relação aos tipos de vedação utilizada.

3.4.3 Tipos de tampas para frascos e concentrações de ágar na maturação *in vitro* de embriões somáticos em frascos

Para número de plântulas formadas, a interação, a concentração de ágar e a tipos de tampas para frascos não foi significativa. Somente apresentaram diferença estatística, a concentração de ágar e forma de vedação, separadamente.

O uso de tampas Biosama[®] apresentou maior número de plântulas, cerca de 0,64 plântulas (Figura 36). O uso de tampas convencionais e de tampas convencionais com PVC não diferiu estatisticamente entre si, apresentando menores valores.

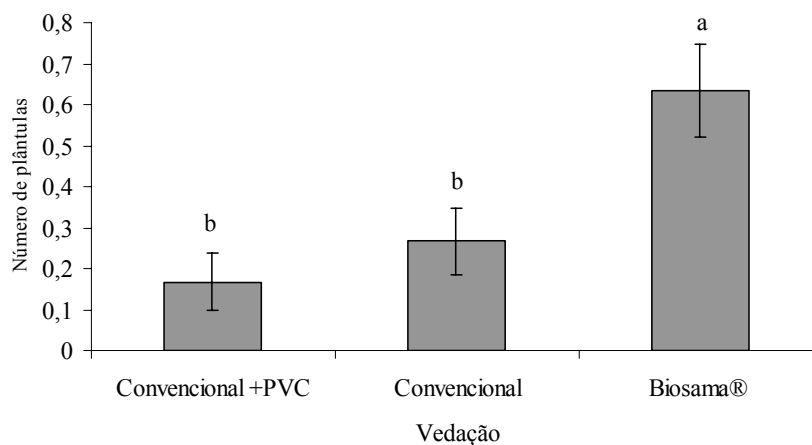


Figura 36 Número médio de plântulas de murici-pequeno *in vitro* a partir de embriões somáticos em diferentes vedações, após 60 dias de incubação em meio WPM. Médias seguidas de mesma letra minúscula, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, em relação aos tipos de tampas para frascos utilizados.

A utilização de 0,8% de ágar favoreceu o maior número de plântulas (0,60 plântulas), e o uso das concentrações de 0,6 e 0,7% de ágar não diferiram entre si, apresentando menores valores (Figura 37).

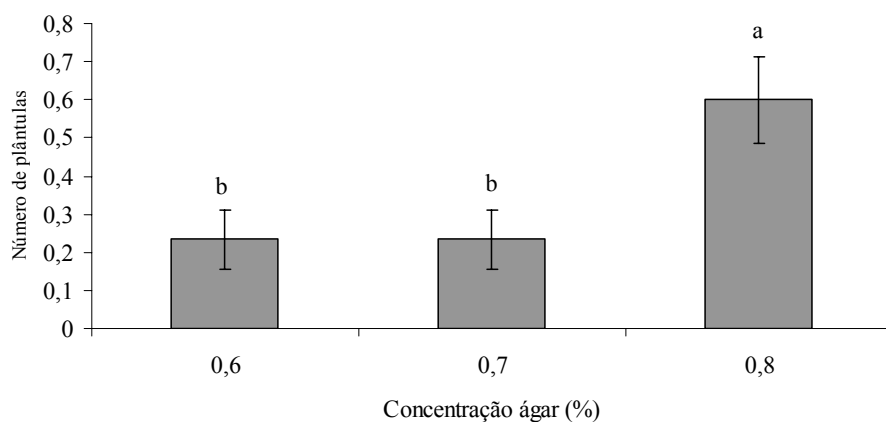


Figura 37 Número médio de plântulas de murici-pequeno *in vitro* a partir de embriões somáticos em diferentes concentrações de ágar, após 60 dias de incubação em meio WPM. Médias seguidas de mesma letra minúscula, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, em relação à concentração de ágar utilizada.

Para número de plântulas normais, a interação entre concentração de ágar e tipos de tampas para frascos não foi significativa estatisticamente. Somente o tipo de tampas foi significativo estatisticamente, separadamente.

Os resultados encontrados demonstraram uma superioridade da tampa Biosama[®], com maior número médio de plântulas normais (0,20 plântulas) (Figura 38). Os demais tipos de tampas utilizados não diferiram entre si, demonstrando o mesmo valor médio de plântulas normais (0,033 plântulas).

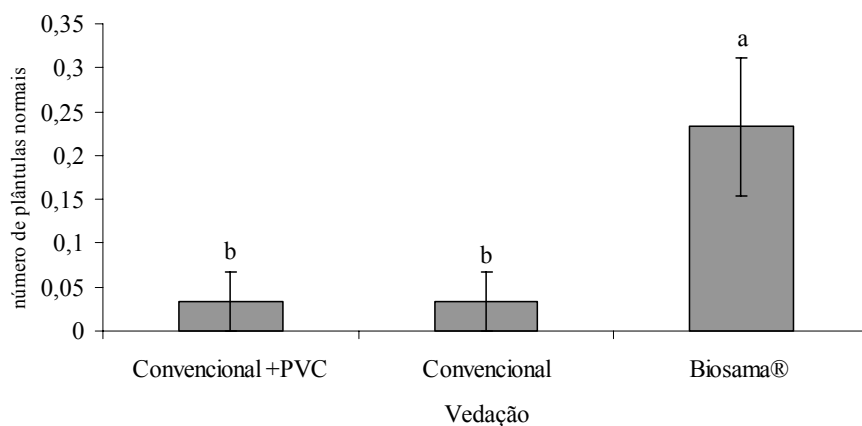


Figura 38 Número médio de plântulas normais de murici-pequeno *in vitro* a partir de embriões somáticos em diferentes vedações, após 60 dias de incubação em meio WPM. Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, em relação aos tipos de tampas para frascos utilizados.

Para número médio de plântulas hiper-hídricas, a interação tipos de tampas e ágar, não foi estatisticamente diferente ao nível de 5%. Somente os tipos de tampa, separadamente, foram significativos.

O uso da tampa comercial Biosama® apresentou maior número médio de plântulas hiper-hídricas (0,43 plântulas), mas não diferindo de tampa convencional (0,2 plântulas) (Figura 39).

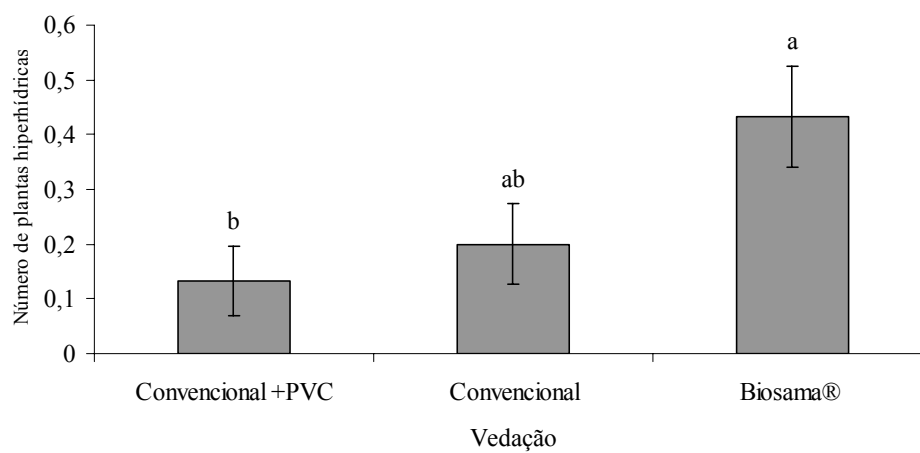


Figura 39 Número médio de plântulas hiper-hídricas de murici-pequeno *in vitro* a partir de embriões somáticos em diferentes vedações, após 60 dias de incubação em meio WPM. Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, em relação aos tipos de tampas para frascos utilizados.

Para formação de raiz, somente tipos de vedação e concentração de ágar, separadamente, apresentaram significância em nível de 5% de probabilidade.

Os resultados encontrados demonstraram que o uso de tampas biosama® teve maior formação de raízes (56,67%) que as demais formas de vedação (Figura 40).

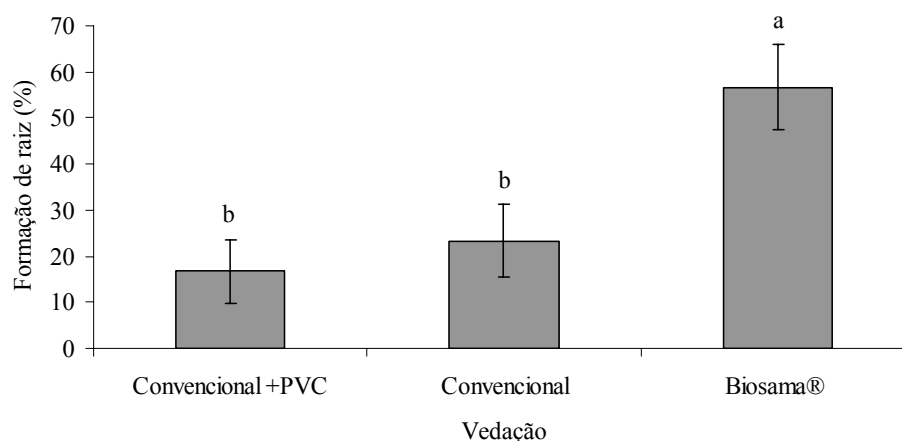


Figura 40 Formação de raiz de murici-pequeno *in vitro* a partir de embriões somáticos em diferentes formas de vedação, após 60 dias de incubação em meio WPM. Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, em relação aos tipos de tampas para frascos utilizados.

A concentração de 0,8% de ágar proporcionou maior formação de raízes (50%), sendo que sua formação foi duas vezes maior que as outras concentrações utilizadas (Figura 41).

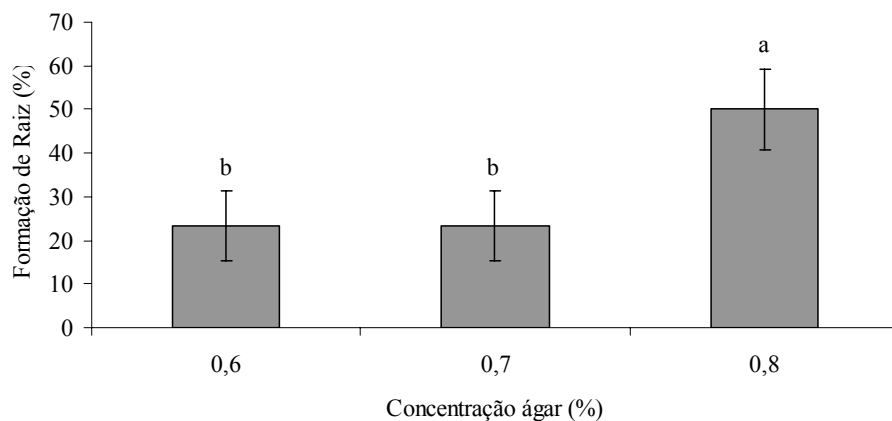


Figura 41 Formação de raiz de murici-pequeno *in vitro* a partir de embriões somáticos em diferentes concentrações de ágar, após 60 dias de incubação em meio WPM. Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, em relação aos tipos de tampa para frascos utilizada.

Para formação de calos, a interação tipos de tampas x concentração de ágar, não apresentou significância estatística, e somente tipos de tampas individualmente, foram significativos.

Os resultados encontrados nas diferentes tipos de tampas demonstraram que, tanto para tampas convencionais com PVC, como para tampas biosama[®], os valores não diferiram estatisticamente, apresentando maior presença de calos nos frascos, mas para tampas biosama[®] não diferiram dos valores encontrados para tampa convencionais (Figura 42). Os valores encontrados para biosama[®], tampas convencionais com PVC e tampas convencionais sem PVC foram de 70%, 73,33% e 43,33% de calos, respectivamente.

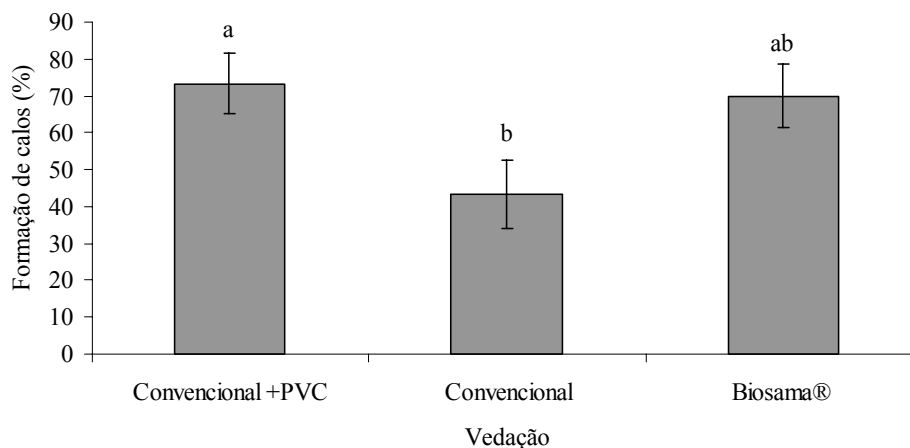


Figura 42 Formação de calos de murici-pequeno *in vitro* a partir de embriões somáticos em diferentes formas de vedação, após 60 dias de incubação em meio WPM. Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, em relação aos tipos de tampas para frascos utilizados.

Para formação de embriões somáticos secundários, novamente não foi observada interação entre os tipos de tampas e ágar, e somente foi significativa os tipos de tampas separadamente.

Os resultados demonstraram que, como para presença de calos, as tampas biosama® e Convencional com PVC apresentaram maior formação de embriões somáticos secundários (83,33% e 76,67%, respectivamente), não diferindo estatisticamente entre si. Já a utilização de tampas convencionais sem o PVC apresentou menos formação de embriões somáticos secundários, mas não diferindo estatisticamente das tampas comerciais biosama® (Figura 43).

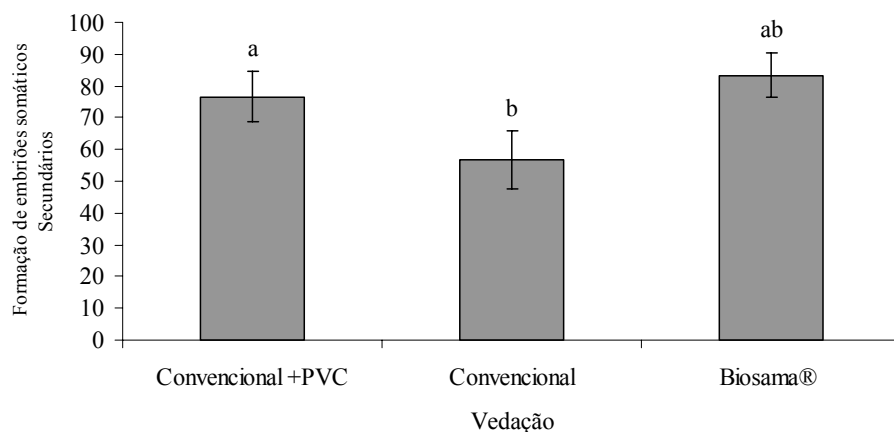


Figura 43 Formação de embriões somáticos secundários de murici-pequeno *in vitro* obtidos a partir de embriões somáticos em diferentes tipos de vedação, após 60 dias de incubação em meio WPM. Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, em relação aos tipos de tampas para frascos utilizados.

Corroborando os resultados encontrados em murici-pequeno, Ribeiro et al. (2009) trabalhando embriogênese somática em berinjela, encontraram maior taxa de crescimento e desenvolvimento dos embriões utilizando tampas que permitiram trocas gasosas.

Resultados semelhantes foram observados por Santos (2007) trabalhando com cultivo *in vitro* de videira. O autor observou que plântulas obtidas *in vitro* apresentaram maiores números de folhas, área foliar, comprimento da parte aérea e sistema radicular, quando cultivadas em frascos com tampas que permitiam trocas gasosas.

Yadav, Gaur e Garg (2003) conseguiram reduzir a hiper-hidricidade na micropropagação de cravos (*Dianthus caryophyllus*), utilizando concentrações de 0,7% a 0,8% de ágar. Em algumas concentrações, a hiper-hidricidade foi eliminada e a multiplicação dos brotos foi aumentada.

Muthappa e Narayanaswamy (1998), trabalhando com efeitos de diferentes concentrações de ágar na incidência de hiper-hidricidade em cravos (*Dianthus caryophyllus*), concluíram que a concentração de 0,8% de ágar produziu um número mais elevado de plantas *in vitro* normais. Estes resultados são semelhantes aos encontrados no presente trabalho.

4 CONCLUSÃO

O uso da citocinina, cinetina juntamente com a auxina, ANA induzem formação de embriões somáticos no segundo (4,76 μM de CIN e 0,54 μM de ANA) e terceiro (5,17 μM de CIN e 10,54 μM de ANA) subcultivos.

O uso de alta concentração de ANA (537,06 μM) favorece a formação de embriões somáticos.

O uso de GA_3 na concentração de 28,87 μM favorece a formação de plântulas a partir de embriões somáticos.

Recomenda-se para redução da hiper-hidricidade o uso de tampas sem PVC para tubos de ensaio e tampa comercial Biosama[®] para frascos.

O meio de cultura WPM suplementado com 3% de sacarose e solidificado com 0,8% de ágar reduz a hiper-hidricidade de embriões somáticos *in vitro*.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, E. P. de; OLIVEIRA, R. P. de; DANTAS, J. L. L. Protocolo para a embriogênese somática do mamoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 10, p. 2017-2024, out. 2000.

AMMIRATO, P. V. Hormonal control of somatic embryo development from cultured cells of caraway. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 59, n. 4, p. 579-586, 1977.

AUGUSTO, C. S. S. **Micropropagação da amoreira-preta cv. Brazos**. 2001. 132 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

BERTONI, B. W. et al. Micropropagação de *Calendula officinalis* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 2, p. 48-54, 2006.

BEZERRA, J. S.; WILLADINO, L.; CAMARA, T. R. Crescimento de calos embriogênicos de milho submetidos ao estresse salino. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 2, p. 259-263, 2001.

BORNMAN, C. H.; VOGELMANN, T. C. Effect of rigidity of gel medium on bezyladenine-induced adventitious bud formation and vitrification *in vitro* in *Picea abies*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 61, n. 3, p. 505-512, July 1984.

CALIGARI, P. D. S.; SHOET, S. Variability in somatic embryos. In: REDENBAUGH, K. (Ed.). **Synseeds: application of synthetic seeds in crop improvement**. Boca Raton: CRC, 1993. p. 163-174.

CARVALHO, D. C. de et al. Embriogênese somática do caquiizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 2, p. 280-283, mar./abr. 2004.

CHÉE, R. P.; CANTLIFFE, D. J. Somatic embryony patterns and plant regeneration in *Ipomoea batatas* Poir. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Wallingford, v. 24, n. 6, p. 955-958, Dec. 1988.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 961-965, jul./ago. 2005.

FERREIRA, D. F. **Sistema SISVAR para análises estatísticas**: manual de orientação. Lavras: UFLA, 2000. 37 p.

FLORES, R. et al. Embriogênese somática e organogênese indireta em *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 993-995, 2007. Suplemento.

FONTES, M. A. et al. Hyperhydricity in pepper plants regenerated *in vitro*: involvement of BiP (Binding Protein) and ultrastructural aspects. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 1, p. 81-87, Mar. 1999.

FORTES, G. R. de L. Controle da vitrificação na cultura *in vitro* da amoreira (*Rubus* sp.) cv. Ébano, através da manipulação dos compostos nitrogenados, ágar e sacarose. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 13, n. 3, p. 305-306, out. 1991.

FUJIMURA, T.; KOMAMINE, A. Effects of various growth regulators on the embryogenesis in a carrot cell suspension culture. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v. 5, p. 359-364, 1975.

1

2 GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**: part 1, the technology. Edington: Exegetics, 1996. 574 p.

GONÇALVES, L. A. **Herreria salsaparilha Martins (Herreriaceae)**: anatomia, citogenética, citometria de fluxo e propagação *in vitro*. 2004. 88 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA CNPH, 1998. v. 1, p. 183-260.

GRAY, D. J. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) cultivars. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 79, n. 5, p. 542-546, Nov. 1992.

GRAY, D. J.; BENTON, C. M. Micropropagation and plant establishment of muscadine grape. **Proceedings of Florida State Horticultural Society**, Hruiter Haven, n. 103, p. 300-302, 1990.

GUERRA, M. P. et al. Biotecnologia de coníferas: indução e estabelecimento de linhagens celulares poliembriogênicas de *Araucaria angustifolia* e *Pinus elliottii* var. *elliottii*. In: CONGRESSO FLORESTAL PANAMERICANO, CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 7., 1993, Curitiba. **Anais...** Curitiba: SBS, 1993. v. 1, p. 87-91.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. v. 2, p. 533-568.

HAKMAN, I.; ARNOLD, S. von. Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of *Picea glauca*: white spruce. **Physiology Plant**, Minneapolis, v. 72, p. 579-587, 1988.

HALPERIN, W.; WETHERELL, D. F. Adventive embryony in tissue cultures of the wild carrot, *Daucus carota*. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 51, p. 274-283, 1964.

HAN, B. H.; PAEK, K. Y.; CHOI, J. K. Prevention of vitrification of *Gypsophila paniculata* regenerated *in vitro*. **Journal of Korean Society for Horticultural Science**, Seoul, v. 32, n. 4, p. 518-524, 1991.

KOMAMINE, A. et al. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry and molecular biology. ***In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant***, Wallingford, v. 28, n. 1, p. 11-14, Feb. 1992.

LAI, C. C. et al. Enhancement of *in vitro* growth of papaya multishoots by aeration. ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, Dordrecht, v. 53, n. 3, p. 221-225, May 1998.

LAMB, C. R. C.; MILACH, S. C. K. Regeneração de plantas a partir de segmentos de base de folhas em aveia. ***Ciência Rural***, Santa Maria, v. 31, n. 5, p. 751-755, set./out. 2001.

LENIS-MANZANO, S. J. et al. Histologia da embriogênese somática induzida em embriões de sementes maduras de *Urochloa brizantha* apomítica. ***Pesquisa Agropecuária Brasileira***, Brasília, v. 45, n. 5, p. 435-441, maio 2010.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. ***Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society***, Seattle, v. 30, p. 421-427, 1980.

LORENZI, H. ***Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil***. São Paulo: Nova Odessa, 2002. v. 1, 386 p.

MATSUMOTO, K. et al. Embriogênese somática a partir de folhas imaturas de mandioca *in vitro*. ***Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal***, Londrina, v. 3, n. 2, p. 107-110, 1991.

MICHOUX-FERRIERE, N.; GROUT, H.; CARRON, M. P. Origen and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae). ***American Journal of Botany***, Chicago, v. 79, n. 2, p. 174-180, 1992.

MILLS, D.; YANQING, Z.; BENZIONI, A. Improvement of jojoba shoot multiplication *in vitro* by ventilation. ***In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant***, Wallingford, v. 40, n. 4, p. 396-402, July/Aug. 2004.

MURASHIGUE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. ***Physiologia Plantarum***, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

MUTHAPPA, N. K.; NARAYANASWAMY, P. Effects of different levels of agar on the incidence of vitrification *in vitro* grown carnations. ***Journal of Agricultural Sciences***, Karnataka, v. 11, n. 3, p. 762-764, 1998.

NEWCOMB, W.; WETHERELL, D. F. The effects of 2,4,6-trichlorophenoxyacetic acid on embryogenesis in wild carrot tissue cultures. ***Botanical Gazette***, Chicago, v. 131, p. 242-245, 1970.

NOGUEIRA, R. C. et al. Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). ***Ciência e Agrotecnologia***, Lavras, v. 28, n. 5, p. 1053-1059, set./out. 2004.

_____. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno. ***Ciência e Agrotecnologia***, Lavras, v. 31, n. 2, p. 366-370, mar./abr. 2007.

PARK, S. W. et al. Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on the hyperhydricity of potato shoots *in vitro*. ***Scientia Horticulturae***, Amsterdam, v. 99, n. 2, p. 199-205, Feb. 2004.

PEREIRA, A. R. et al. Embriogênese somática direta em explantes foliares de *Coffea arabica* l. cv. Acaiá Cerrado: efeito de cinetina e ácido giberélico. ***Ciência e Agrotecnologia***, Lavras, v. 31, n. 2, p. 332-336, mar./abr. 2007.

PHILLIPS, G. C.; COLLINS, G. B. Induction and development of somatic embryos from cell suspension cultures of soybean. ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, Dordrecht, v. 1, p. 123-129, 1981.

QUATRANO, R. S. The role of hormones during seed development. In: DAVIES, P. J. (Ed.). **Plant hormones and their role in plant growth and development**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1987. p. 494-514.

REYNOLDS, J. F.; MURASHIGE, T. Asexual embryogenesis in callus cultures of palms. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Wallingford, v. 15, p. 383-387, 1979.

RIBEIRO, A. P. O. et al. The influence of flask sealing on *in vitro* morphogenesis of eggplant (*Solanum melongena* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Wallingford, v. 45, n. 4, p. 421-428, Aug. 2009.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. de. **Plantas medicinais no domínio dos cerrados**. Lavras: UFLA, 2001. 180 p.

ROUT, G. R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, n. 2, p. 91-120, Apr. 2000.

SAHER, S. et al. Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 120, n. 1, p. 152-161, Jan. 2004.

SANNOMIYA, M. et al. Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. leaf extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 112, n. 2, p. 319-326, 2007.

SANTOS, R. P. **Respostas morfofisiológicas de videira cultivadas sob diferentes condições *in vitro***. 2007. 128 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

SCHENK, R. O.; HILDEBRANDT, A. C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous plant cell cultures. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 50, p. 199-204, 1972.

SHARP, W. R. et al. The physiology on *in vitro* asexual embryogenesis. **Horticultural Review**, New York, v. 2, p. 268-310, 1980.

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. 2009. 74 p. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA Hortaliças, 1999. v. 1, 509 p.

VAEZ, J. R. **Avaliação de fatores associados á regeneração *in vitro* e transformação genética de cinco cultivares de mandioca.** 2007. 138 p. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

WINNAAR, W. Clonal propagation of papaya *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 12, n. 3, p. 305-310, Sept. 1988.

YADAV, M. K.; GAUR, A. K.; GARG, G. K. Development of suitable protocolo to overcome hyperhydricity in carnation during micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 72, n. 2, p. 153-156, Sept. 2003.

ZHENG, L. et al. Cysteine desulfurase activity indicates a role for NifS in metallocluster biosynthesis. **Proceedings National Academy of Sciences**, Washington, v. 90, n. 7, p. 2754-2758, Apr. 1993.

ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **Plant Cell**, Rockville, v. 5, n. 10, p. 1411-1423, Oct. 1993.

ZIV, M. *In vitro* acclimatization. In: AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T.; SMITH, M. A. L. (Ed.). **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 493-516.

_____. Vitrification: morphological and physiological disorders of in vitro plants. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation: technology and applications**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 45-69.

CAPÍTULO 3

Análises moleculares da embriogênese somática de murici-pequeno

RESUMO

A *Byrsonima intermedia* A. Juss., espécie do cerrado, é conhecida vulgarmente por murici-pequeno. É uma espécie com grande potencial medicinal e com grande quantidade de taninos. Mas apresenta dificuldade de germinação, desenvolvimento lento e dormência tegumentar. Com objetivo de conseguir maior propagação desta espécie, surge uma ferramenta, a cultura de tecidos. Dentre as técnicas de cultura de tecidos destaca-se a embriogênese somática. E para maior compreensão deste fenômeno, objetivou-se no presente trabalho, realizar análises moleculares da embriogênese somática de murici-pequeno. As análises moleculares iniciaram-se com a identificação dos genes e o desenho dos *primers*. Foi realizada a extração dos RNAs dos diferentes explantes (calos pró-embriogênicos e embriogênicos e embriões somáticos), obteve-se o cDNA e a amplificação dos fragmentos. Foi realizada então a clonagem a transformação bacteriana, a PCR da colônia, a extração do plasmídeo e o sequenciamento. Finalizando com as análises do sequenciamento. Mesmo sendo observado amplificação de fragmentos para os genes *AGLI*, *LECI*, *SERK* e *BBM*, não foi possível realizar a RT-qPCR devido a dificuldade de realizar o sequenciamento dos genes em virtude de tratar-se de planta nativa.

Palavras-chave: *Primers* degenerados, sequenciamento, PCR, *LEC 1*, *LEA*, *BBM*, *SERK*, *AGL 1*.

ABSTRACT

Byrsonima intermedia A. Juss., is a Brazilian species usually known as 'murici-pequeno'. It is a species with great medicinal potential and contains a large quantity of tannins. But the plant has difficulty germinating, and has slow development and tegumental dormancy. In this context, tissue culture techniques are presented as an alternative to sexual propagation, the use of somatic embryogenesis being of particular interest. This work aimed to perform a molecular analysis of somatic embryogenesis of murici-pequeno. The molecular analysis began with gene identification and then by drawing the primers. The RNAs of the different explants (pro-embryogenic and embryogenic calluses and somatic embryos) were extracted, then the cDNA was obtained and the fragments amplified. Subsequently, cloning of the bacterial transformation, PCR of the colony, plasmid extraction and sequencing were performed, concluding with an analysis of the sequencing. Even by observing the amplified fragments for genes *AGLI*, *LECI*, *SERK* and *BBM*, it was not possible to perform the RT-qPCR because of difficulties in carrying out gene sequencing; this due to murici-pequeno being a native plant.

Keywords: degenerate primers, sequencing, *PCR*, *LEC 1*, *LEA*, *BBM*, *SERK*, *AGL 1*.

1 INTRODUÇÃO

A exploração dos recursos genéticos das plantas medicinais no Brasil está relacionada, em grande parte, à coleta extensiva e extrativista do material silvestre. Este fato se torna mais marcante quando se consideram as espécies nativas, cujas pesquisas básicas ainda são incipientes. Pouquíssimas espécies chegam ao nível de serem cultivadas, mesmo em pequena escala.

A espécie *Byrsonima intermedia* A. Juss., conhecida popularmente como murici-pequeno, é um arbusto do Cerrado considerado medicinal por sua propriedade adstringente nas diarreias e disenterias. Porém, a propagação por meio de sementes do gênero *Byrsonima* esbarra em problemas como baixa taxa de germinação e emergência lenta das plântulas.

Devido à dificuldade de propagação do murici-pequeno e em face ao seu potencial medicinal, a técnica de cultura *in vitro* é um promissor instrumento para o desenvolvimento de pesquisas que estabeleçam formas alternativas para a produção de mudas, conservação e melhoramento do material genético desta espécie.

Dentre as técnicas de cultura de tecidos destaca-se, a embriogênese somática, direta, formando embriões diretamente a partir do explante, e indireta, passando pela fase de calos.

A embriogênese somática, formação do embrião a partir de células somáticas, sem fusão de gametas, é um mecanismo de reprodução assexuada que ocorre naturalmente em algumas espécies, mas que pode ser induzido *in vitro* de modo generalizado. Embora embriões somáticos induzidos *in vitro* e zigóticos se desenvolvam por vias diferentes, eles são morfológicamente semelhantes, o que torna os somáticos um sistema modelo para estudos embriológicos. A indução *in vitro* de embriões somáticos permite também aplicações tecnológicas, como a

propagação vegetativa em larga escala, a formação de bancos de germoplasma criopreservados ou como alvo para eventos de transformação genética.

Este desenvolvimento é quase empírico. O conhecimento sobre os primeiros eventos da transição de células somáticas para embriogênicas é escasso (SCHMIDT et al., 1997) e as análises que permitem acompanhar esses eventos, e conseqüentemente, a obtenção, ou não, de um cultivo embriogênico, são análises histológicas das características diferenciadoras entre células somáticas e embriogênicas.

Em função de maior sensibilidade e capacidade de amostragem, análises que utilizem marcadores moleculares ligados aos eventos de transição podem ser de extrema utilidade para os trabalhos de desenvolvimento de protocolos de embriogênese somática. *BBM*, *LEC1*, *AGL 1*, *LEA* e *SERK* são genes relacionados à embriogênese somática (BOUTILIER et al., 2002; HECK et al., 1995; LOTAN et al., 1998; RIDER et al., 2003; STONE et al., 2001; ZUO et al., 2002).

Desse modo, o objetivo deste trabalho é verificar se os genes *BBM*, *LEC1*, *AGL1*, *LEA* e *SERK* podem ser usados como marcadores moleculares do potencial embriogênico de murici-pequeno.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Identificação dos genes

Para a busca dos genes alvos, foi feita uma análise *in silico* no banco de dados GenBank do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), onde foi feita uma busca das sequências por palavras-chave dos genes *SERK*, *BBM*, *LEA*, *LECI* e *AGLI*. Em seguida foi selecionada uma sequência de aminoácido de cada gene, após essa seleção, cada sequência de aminoácido foi submetida ao tBLASTn (ALTSCHUL et al., 1997) com o objetivo de encontrar sequências similares podendo assim obter uma maior abrangência. Dessas foram selecionadas até no máximo 10 sequências de nucleotídeos por gene {*SERK*: [gi|224589644|gb|FJ708762.1| (*Arabidopsis thaliana*), gi|225447734:1-1833 PREDICTED: (*Vitis vinifera*), gi|115475022:285-2159 (*Oryza sativa*), gi|124303892:168-2036 (*Hordeum vulgares*), gi|90891655|gb|AY791293.2| (*Cocos nucifera*), gi|148923084|gb|EF623824.1| (*Solanum peruvianum*), gi|242065529:142-2022 (*Sorghum bicolor*), gi|126466785|gb|EF175215.1| (*Solanum tuberosum*), gi|219886134:224-2104 (*Zea mays*), gi|24935323:231-2114 (*Medicago truncatula*)]; *BBM*: [gi|151936653|gb|EF687843.1| (*Arabidopsis thaliana*), gi|21069056:2017-2248, 2579-2993, 3221-3303, 3420-3428, 3522-3610, 3771-3844, 3970-4020, 4152-4228, 4311-5035 (*Arabidopsis thaliana*), gi|186523638|ref|NM_121749.2| (*Arabidopsis thaliana*), gi|21069056:2017-2248, 2579-2993, 3221-3303, 3420-3428, 3522-3610, 3771-3844, 3970-4020, 4152-4228, 4311-5035 (*Arabidopsis thaliana*), gi|46451392|gb|AY585684.1| (*Arabidopsis thaliana*), gi|58761186|gb|AY899909.1| (*Medicago truncatula*), gi|224098763|ref|XM_002311223.1| (*Populus trichocarpa*), gi|226500349:207-2246 (*Zea mays*)]; *AGLI*: [gi|145332890:322-1047 (*Arabidopsis thaliana*),

gi|30694874:322-1068 (*Arabidopsis thaliana*), gi|7630060:39005-39231, 40530-40611, 40765-40826, 40956-41055, 41155-41196, 41280-41321, 41430-41621 (*Arabidopsis thaliana*), gi|21404906:322-1068 (*Arabidopsis thaliana*), gi|95981856:76-735 (*Triticum aestivum*), gi|60100355|gb|AY770404.1| (*Lotus corniculatus*), gi|189099168:79-831 (*Capsella bursa-pastoris*), gi|52548103:2960-3186, 4512-4593, 4761-4822, 5343-5442, 5542-5583, 5678-5719, 5824-5973 (*Arabidopsis lyrata*), gi|52548101:1916-2142, 3440-3521, 3675-3736, 3866-3965, 4065-4106, 4190-4231, 4340-4531 (*Arabidopsis thaliana*)] LEC1: [gi|158525286|gb|EU088291.1| (*Glycine latifolia*), gi|170280632:1-52, 1227-1870 (*Brassica napus*), gi|158525284|gb|EU088290.1| (*Glycine latifolia*), gi|158525282|gb|EU088289.1| (*Glycine Max*), gi|46250698:47-670 (*Daucus carota*), gi|145335990:47-763 (*Arabidopsis thaliana*), gi|225897959|dbj|AB493474.1| (*Arabidopsis thaliana*) e LEA: [gi|145360687:61-1407, gi|145360687:61-1407 (*Arabidopsis thaliana*), gi|170009:58-1449 (*Glycine Max*), gi|213053668:59-1255 (*Brassica napus*) e gi|224124227|ref|XM_002330101.1| (*Populus trichocarpa*)] que foram alinhadas no programa BioEdit com a ferramenta clustalW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994), as seqüências foram editadas deletando os GAPS. Após isso, *primers* degenerados foram desenhados no GeneFisher (UNIVERSITY BIELEFELD, 2010) (Tabela 4).

Tabela 4 Sequências dos *primers* degenerados dos genes candidatos, letras que representam a degeneração dos nucleotídeos são: **M** corresponde a A ou C; **R** corresponde a A ou G; **W** corresponde a A ou T; **S** corresponde a C ou G; **Y** corresponde a C ou T; **K** corresponde a G ou T e **N** corresponde a G,A,T ou C.

Gene	Primers
<i>SERK</i>	F: 5'- TTGATGTACCWGCGYARGAGGATC -3' R: 5'-GATGTCGGCTCTTCCTATCATTG-3'
<i>BBM</i>	F: 5'- TAGTTGYARAAGAGAAGGSCAGAC -3 R: 5'- CTGYTCATGTCRAAGTTRGTCAC -3'
<i>AGLI</i>	F: 5'- TCTCTGTCTTGTGTGATGCCGAAG -3' R: 5'- TCCGATTATAATGCTGCGACTG -3'
<i>LEC 1</i>	F: 5'- ARNTWCATGCCAATCGCMAACG -3' R: 5'- GTYRTC GAANYCCAAGCTTGC -3'
<i>LEA</i>	F: 5'- GATAGRCNCMGGKGTGATAGG -3' R: 5'- CCTTAGCNCTCTTTRGCYTTATCC -3'

2.2 Material Vegetal

Os materiais vegetais utilizados foram calos pró-embriogênicos, calos embriogênicos e embriões somáticos de murici-pequeno nas fases cordiforme e torpedos obtidos de acordo com protocolo descrito no Capítulo II. Foram avaliadas as expressões dos genes candidatos em dois tratamentos de diferentes subcultivos [segundo subcultivo (4,76 μ M de CIN e 0,54 μ M de ANA) e terceiro subcultivo (5,17 μ M de CIN e 10,54 μ M de ANA)].

2.3 Extração de RNA

Para os ensaios, foi extraído RNA total em 3 repetições biológicas usando o Kit NucleoSpin® (Macherey-Nagel) de acordo com o protocolo do fabricante. A integridade do RNA extraído foi avaliada em gel de agarose a 1,0% e as amostras foram quantificadas por espectrofotometria (NanoDrop 1000). O grau de pureza das amostras foi determinado pela razão entre A260/A280 e A260/A230, considerada ideal dentro do intervalo entre 1,6 e 2,1. As soluções de RNA das repetições foram reunidas em um *pool* de RNA na concentração final de 1 µg.

2.4 Obtenção da sequência cDNA

Após a extração de RNA, foram sintetizados cDNAs em reações de transcrição reversa usando o Kit *High-Capacity*® (Applied Biosystems) de acordo com protocolo do fabricante. Essas reações foram realizadas com 10 µL do *mix* de reação do kit + 10 µL do *pool* de RNA [1 µg] durante 10 min a 25°C, 120 min a 37°C e 5 min a 85°C.

2.5 Amplificação dos fragmentos

Os *primers* obtidos (Tabela 4) foram testados em diferentes gradientes de temperatura (Tabela 5) para calos embriogênicos e embriões somáticos.

Para a reação foram misturados 1 µL de cDNA [aproximadamente 100 ng], 5,1 µL de água esterilizada, 1,0 µL de tampão de PCR [10X], 0,5 µL de dNTPs *Mix* (10 mmol.L⁻¹), 2 µL de PCR *primer* 1 (10 µmol.L⁻¹) e 0,4 µL de Taq-polimerase [5U/µL].

As amostras foram levadas ao Termociclador Eppendorf Mastercycler gradient em gradientes de temperaturas, 5 minutos a 94°C, ciclo: 30 segundos a 94°C para desnaturação, 30 segundos variando de 46,3°C a 58,6°C, 30 segundos para anelamento a 72°C para extensão e 72°C por 10 minutos para extensão final.

Tabela 5 Diferentes temperaturas de amplificação dos diferentes gradientes.

Gradiente	Temperatura (°C)
1°	46,3
2°	48,4
3°	50,6
4°	52,8
5°	54,8
6°	56,5
7°	57,8
8°	58,6

A amplificação foi avaliada em gel de agarose a 1,0% e após a foto documentação os fragmentos do gel foram isolados com o Kit MiniElute® Gel Extraction (QUIAGEN) de acordo com o protocolo do fabricante, para ser efetuada a clonagem.

2.6 Clonagem e transformação bacteriana

Os fragmentos dos produtos da PCR foram submetidos à clonagem no vetor pGEMTeasy (Promega), seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. O produto da reação da ligação foi utilizado para transformar células competentes

de bactérias *E. coli* DH5 α , em que 2 μ L do produto da ligação foram misturados com 50 μ L de células competentes DH5 α e colocados em gelo por 20 minutos, logo em seguida, 45 segundos a 42°C e, novamente, 2 minutos no gelo. Em seguida, adicionou-se 0,9 mL de meio SOC e incubou-se por uma hora a 37°C. Logo após a incubação, o plaqueamento foi feito utilizando-se alíquotas de 250 μ L de ligação por placa de Petri, contendo 20 mL de meio de cultura Luria-Bertani (LB) + Agar, 40 μ L ampicilina [100 μ g/mL], 25 μ L de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo [40 mg/mL]) e 12 μ L de IPTG (isopropil- β -Ditiogalactopiranosídeo), indutor do *operon* Lac de *E. coli* [100 mg/mL].

Após o plaqueamento, as culturas foram mantidas a 37°C durante 16 horas para permitir o crescimento das colônias bacterianas. Após esse período, as colônias brancas transformadas foram coletadas com auxílio de palitos esterilizados, sendo transferidas individualmente para tubos Falcons de 15 mL contendo 3 mL de meio Luria-Bertani (LB líquido) com ampicilina (100 μ g/mL). Em seguida, os tubos foram mantidos a 37°C em agitador orbital ajustado para 250 x g durante 18 horas, possibilitando o crescimento das células de *E. coli* transformadas.

2.7 PCR de Colônia para confirmação da ligação e transformação

Para confirmação da ligação, foram realizadas reações de PCR de colônias transformadas, utilizando-se os *primers* dos genes estudados. Cada reação contendo 10 μ L de Mix de PCR (5,1 μ L de água estéril, 1 μ L de tampão de PCR [10X], 0,5 μ L de DNTP [10 mmol.L⁻¹], 1 μ L primer, 0,4 μ L de *Taq* DNA Polimerase [5 U/mL]), foi colocada em contato com o resíduo de um palito de madeira estéril encostado na colônia transformada da placa de Petri.

A reação foi submetida à temperatura de 95°C por 5 minutos para lise inicial das bactérias, seguido de 95°C por 30 segundos, 46,3°C a 58,6

(dependendo da temperatura selecionada de cada gene na reação da PCR em gradiente) por 30 segundos, 72°C por 1,5 min, por 40 ciclos, e extensão final a 72°C por 5 min em termociclador Eppendorf Mastercycler gradient. Os produtos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1.5%/EtBr em tampão TAE [1X].

2.8 Extração dos plasmídeos contendo insertos dos cDNA obtidos

Para a extração do plasmídeo foi feito a miniprep com o kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen), de acordo com o protocolo do fabricante.

Após secagem completa, o pellet foi ressuscitado em água estéril, os DNAs plasmidiais foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,0% em tampão TAE [1X].

As bandas selecionadas foram cortadas do gel com o uso de bisturi e purificadas com o kit MiniElute® Gel Extraction (Quiagen) seguindo o protocolo do fabricante. As amostras foram armazenadas a -20°C até serem submetidas à sequenciamento.

2.9 Sequenciamento dos plasmídeos

Antes de realizar o sequenciamento foi feita uma PCR para extração das bandas. Essa etapa foi realizada para evitar que durante o sequenciamento ocorresse a sobreposição dos nucleotídeos.

Os plasmídeos contendo os insertos de cDNA, extraídos dos clones obtidos, foram sequenciados em aparelho sequenciador de DNA, Mega Bace 1000 (AMERSHAM BIOSCIENCES). Para isso, foi utilizado o método

enzimático baseado na síntese de DNA *in vitro* na presença de nucleosídeos trifosfatados terminadores de cadeia (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977).

Os cDNAs purificados foram amplificados por PCR na presença de DNA polimerase, de um *primer* universal (M13).

O sequenciamento foi realizado com o kit “Big Dye Terminator” (Applied Biosystems). Para a reação de sequenciamento, foram adicionados a uma microplaca para PCR contendo 96 cavidades, 1 μL de cada plasmídeo e 4 μL de “Big Dye Terminator” (DNA polimerase/dNTPs/ddNTPs) diluído [4X] no tampão de sequenciamento (Tris-HCl 50 mmol L^{-1} e cloreto de magnésio 1,25 mmol L^{-1}), acrescido de 5 picomoles de *primer forward* M13. A reação foi realizada em termociclador Eppendorf Mastercycler gradient, utilizando-se o seguinte programa: 30 ciclos de 95°C por 20 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C durante 1 minuto.

Os produtos amplificados da reação de sequenciamento foram precipitados, adicionando-se 1 μL de acetato de amônio 7,5 mol.L^{-1} às amostras em cada cavidade da microplaca de PCR. Em seguida, adicionaram-se duas vezes o volume com etanol 95%. Posteriormente, as placas foram vedadas com adesivo, agitadas manualmente por inversão, permanecendo à temperatura ambiente por 15 minutos. Após centrifugação por 45 min a 4.000 xg, 20°C, os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos foram lavados com 100 μL de etanol 70%. As placas foram centrifugadas por 15 min a 4.000 xg, 20°C. Os sobrenadantes foram descartados e as microplacas foram novamente centrifugadas de forma invertida sobre papel absorvente (1.000 xg, 1 min) para remover o excesso de etanol, sendo, em seguida, mantidas a 37°C por 10 min para secagem.

Após adicionar 10 μL de loading solution em cada poço da microplaca, essa foi injetada no Mega Bace 1000. Os parâmetros de eletroforese utilizados foram: voltagem de injeção: 2 Kv; tempo de injeção: 80 segundos; voltagem de

corrida: 6 Kv; tempo de corrida: 240 minutos. As sequências foram determinadas utilizando-se o programa Sequence Analyzer.

2.10 Análises das sequências de cDNA em Bancos de Dados

As sequências de cDNAs dos genes isolados dos tratamentos foram comparadas com aquelas presentes em bancos de dados internacionais “*National Center for Biotechnology Information*”, (NCBI) (BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL - BLAST, 2010).

A similaridade de cada gene foi detectada por comparação com sequências homólogas do NCBI, utilizando-se o programa BlastX (ALTSCHUL et al., 1997). Após cada sequência de cDNA isolada ter sido submetida à análise, foi avaliada a relação de sequências mais similares de genes presentes no GenBank, encontradas pelo programa. O valor de E (“expectation value”), o qual representa a probabilidade de que a homologia encontrada seja devida ao acaso, foi utilizado para indicar a significância da similaridade de sequência encontrada para cada gene.

3 RESULTOS E DISCUSSÃO

3.1 Extração de RNA

Para a identificação dos fragmentos correspondentes aos genes de interesse, o RNA total dos calos embriogênicos e embriões somáticos de murici-pequeno foram extraídos. Já para calos pró-embriogênicos não foi observada a presença de RNA total. Como observado na Figura 44, a presença no gel de duas bandas nítidas representando os RNAs ribossômicos 28S e 18S de célula vegetal mostra que o método utilizado foi eficiente.

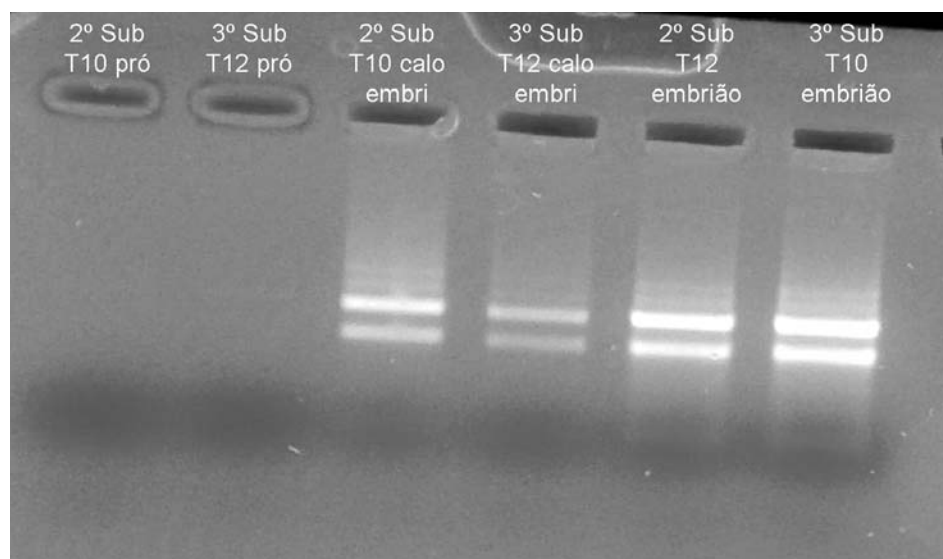


Figura 44 Eletroferograma em gel de agarose (1%) de RNA total na concentração média de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ extraído de calos pró-embriogênicos e embriogênicos e embriões somáticos de murici-pequeno.

3.2 Amplificação dos *primers*

Para a amplificação dos fragmentos foram todos amplificados, menos o fragmento correspondente ao gene *LEA*.

A não amplificação do gene *LEA* pode ser devida ao uso de calos embriogênicos e embriões somáticos ainda imaturos, sendo que o gene *LEA* se expressa tardiamente na embriogênese (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001; WISE; TUNNACLIFFE, 2004).

Foram selecionados para prosseguir o trabalho a temperatura considerada ótima para cada *primer*. Para *AGLI* foi escolhido a temperatura de 46,3°C, para *BBM* e a temperatura de 54,8°C e para *SERK* e *LECI* a temperatura 56,5°C para a amplificação (Figura 45).

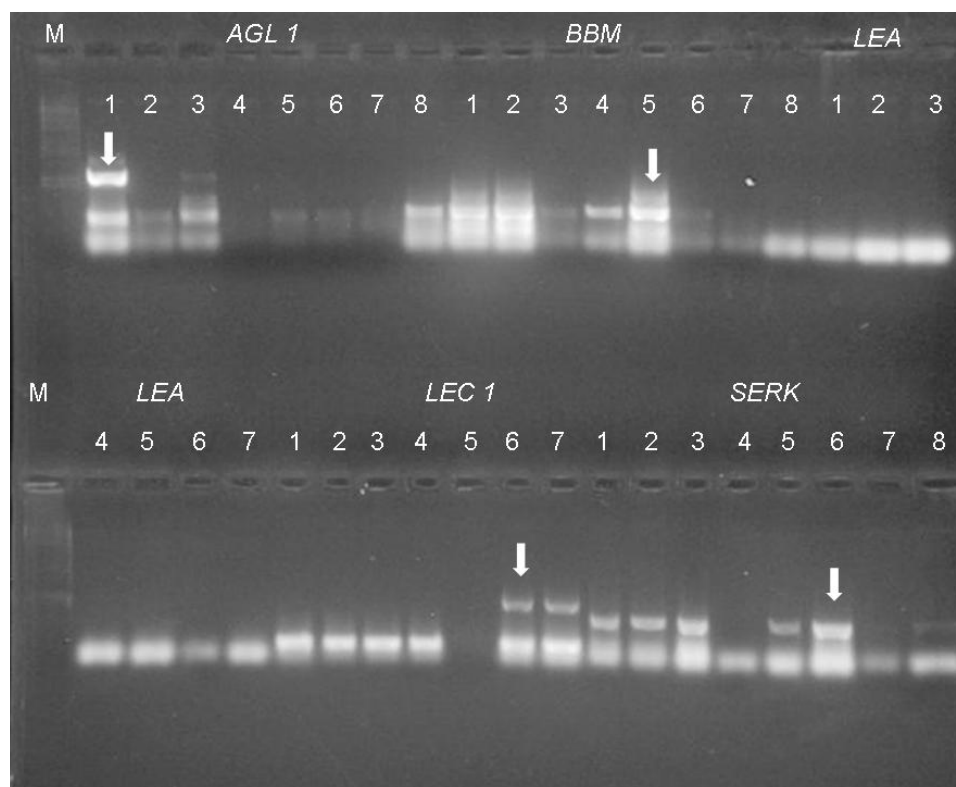


Figura 45 Eletroferograma em gel de agarose (1,0 %) da amplificação dos genes por PCR em gradiente utilizando diferentes *primers* em diferentes temperaturas de amplificação.

3.3 PCR de Colônia para confirmação da ligação e transformação

Foi observada a presença de colônias apenas para o *AGLI* e *LEC1*.

Para a PCR de colônia foi observada a presença de bandas em todas as repetições realizadas sendo escolhidas apenas 3 repetições por gene. As repetições escolhidas foram *AGLI-1*, *AGLI-3* e *AGLI-5*, e *LEC1-1*, *LEC1-3* e *LEC1-4* (Figura 46).

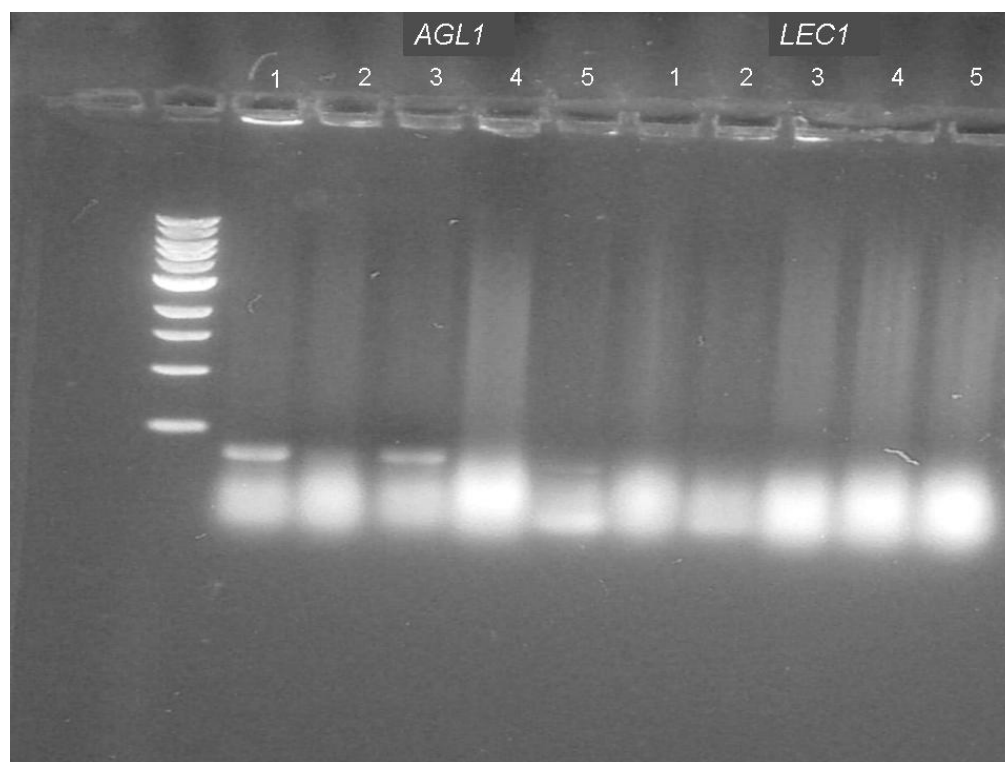


Figura 46 Eletroferograma em gel de agarose (1,0 %) de cDNAs obtidos da amplificação por PCR de colônia.

Esses resultados demonstram que a inserção dos genes e o crescimento das colônias foram satisfatórios para prosseguir os trabalhos com os genes *AGL1* e *LEC1*.

3.4 Extração dos plasmídeos contendo insertos dos cDNA obtidos

Nesse PCR foi observada a presença de plasmídeos em todas as repetições utilizadas de ambos os genes (Figura 47).

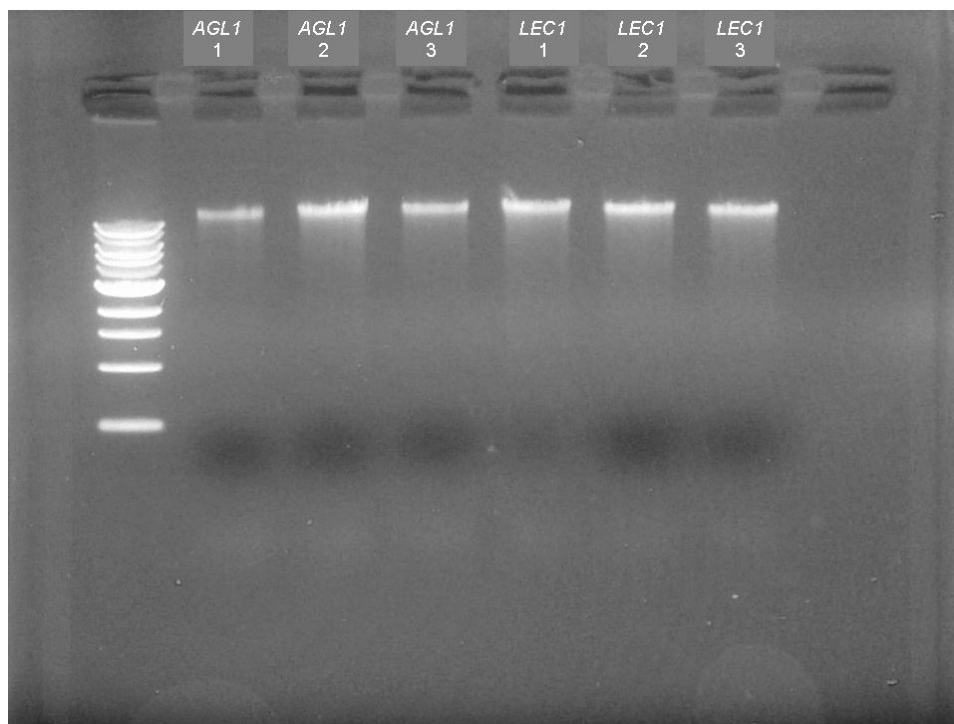


Figura 47 Eletroferograma em gel de agarose (1,0 %) de cDNAs obtidos da amplificação por PCR do plasmídeo com genes referentes a *AGL1* e *LEC1*.

Foi observada também a ausência de resíduos no fim da eletroforese, demonstrando, assim, que o resultado da Miniprep isolou DNA plasmidial sem impurezas que podem interferir nos resultados posteriores.

3.5 Sequenciamento dos plasmídeos

No PCR do DNA plasmídial foram selecionados dois fragmentos para *AGL1* e um fragmento para *LEC1*. Essas foram excisadas do gel e purificadas para serem submetidas ao sequenciamento. Utilizando o *primer M13* (*primer* utilizado na reação do sequenciamento) não foi observada amplificação (Figura 48).

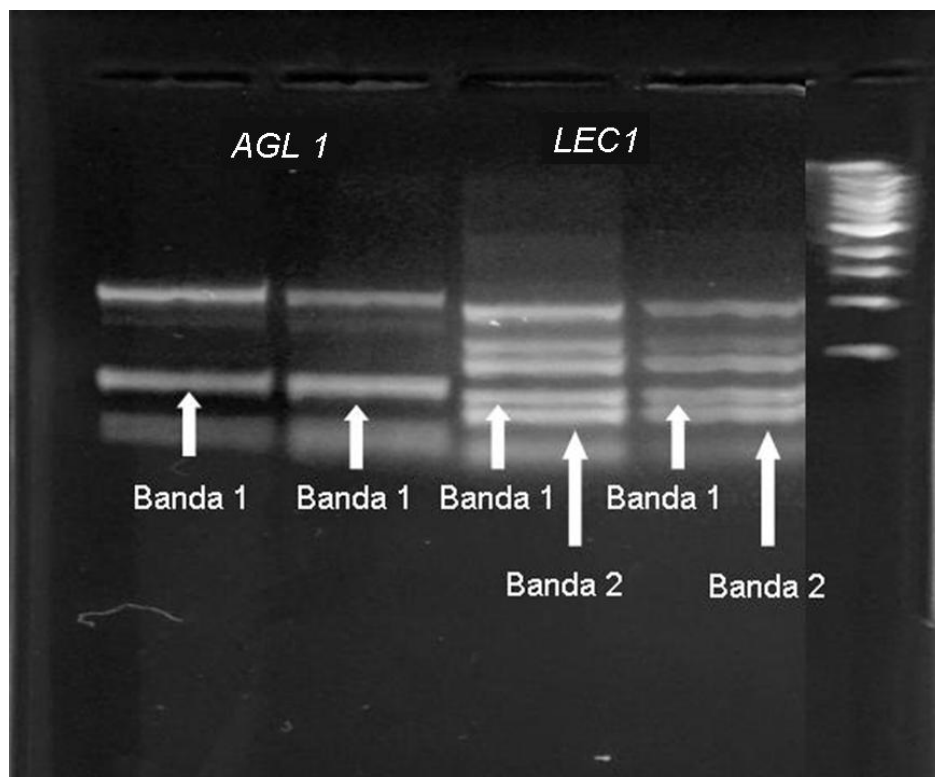


Figura 48 Eletroferograma em gel de agarose (1,0 %) de cDNAs obtidos da amplificação por PCR para os cortes de sequenciamento utilizando *AGLI*, *LEC1* e *M13*.

3. 6 Análises das seqüências de cDNA em Bancos de Dados

O sequenciamento para *AGLI* não foi satisfatório em ambas os fragmentos, mas para *LEC1* foi encontrada duas seqüências. Uma *sense* e outra *anti-sense* (Tabela 6 e 7).

Tabela 6 Genes homólogos encontrados para fita *sense* do gene *LECI*, gi: gene index , há homologia dessa sequência com o banco de dados NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI, 2010).

Gi	Homologia (NCBI)	E-value
gb EFO57915.1	Proteína responsável por transporte de sódio (<i>E. coli</i>)	7e-13
ZP_06355850.1	Proteína hipotética (<i>Citrobacter youngae</i>)	3e-10
YP_001572777.1	Transporte (<i>Salmonella entérica</i>)	7e-10
ZP_03700596.1	<i>Flavobacteria bacterium</i>	1.8

Tabela 7 Genes homólogos encontrados para fita *anti-sense* do gene *LECI*, gi: gene index, áa homologia dessa sequência com o banco de dados NCBI (NCBI, 2010).

Gi	Homologia (NCBI)	E-value
ZP_05989919.1	Subunidade da beta desidrogenase (<i>Mannheimia haemolytica</i>)	4e-04
YP_001454645	hypothetical protein (<i>Citrobacter koseri</i>)	0.001
ZP_07246263.1	Subunidade da beta desidrogenase (<i>Escherichia coli</i>)	0.003
ZP_04627118.1	Subunidade da beta desidrogenase (<i>Yersinia bercovieri</i>)	0.002

Apesar de termos encontrado sequências utilizando o *primer LEC1*, eles não apresentaram homologia com o gene procurado.

Isso se deve à deleção dos GAPS durante o alinhamento e ao uso de *primers* degenerados que, devido a essa degeneração, pode se ligar a várias outras partes do gene.

4 CONCLUSÃO

Todos os fragmentos foram amplificados com sucesso, menos o fragmento correspondente ao gene *LEA*.

O sequenciamento para os gêneses não foi satisfatório, somente para *LEC1* que foi encontrada duas sequências. Uma *sense* e outra *anti-sense*. Mas eles não apresentaram homologia com o gene procurado.

5 PERSPECTIVAS FUTURAS

Devido à falta de resultados satisfatório na fase de sequenciamento dos genes não foi possível realizar a RT-qPCR, mesmo sendo observada a amplificação de fragmentos para os genes *AGLI*, *LECI*, *SERK* E *BBM*.

De acordo com os resultados obtidos, observa-se que os métodos utilizados foram de grande valia para otimização dos protocolos. Entretanto, sugere-se a substituição dos *primers*.

REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL. **BLAST assembled refseq genomes**. Disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 10 nov. 2010.

BOUTILIER, K. et al. Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. **Plant Cell**, Baltimore, v. 14, n. 8, p. 1737-1749, Aug. 2002.

HECK, G. R. et al. AGL15, a MADS domain protein expressed in developing embryos. **Plant Cell**, Rockville, v. 7, n. 8, p. 1271-1282, Aug. 1995.

LOTAN, T. et al. Arabidopsis *LEAFY COTYLEDON1* is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. **Cell**, Cambridge, v. 93, n. 7, p. 1195-1205, Apr. 1998.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Biotechnology information**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 12 dez. 2010.

RAVEN, P. R.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 728 p.

RIDER, S. D. et al. Coordinate repression of regulators of embryonic identity by Pickle during germination in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, Oxford, v. 35, n. 1, p. 33-43, July 2003.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SCHMIDT, E. D. L. et al. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cell cultures. **Development**, Cambridge, v. 124, n. 10, p. 2049-2062, May 1997.

STONE, S. L. et al. Leafy Cotyledon2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 98, n. 20, p. 11806-11811, Sept. 2001.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, n. 12, p. 4673-4680, Dec. 1994.

UNIVERSITY BIELEFELD. **GeneFisher2**: submission. Disponível em: <<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher2/submission.html>>. Acesso em: 15 dez. 2010.

WISE, J. M.; TUNNACLIFFE, A. POPP the question: what do *LEA* proteins do? **Trends in Plant Science**, London, v. 9, n. 1, p. 13-17, Jan. 2004.

ZUO, J. et al. The Wuschel gene promotes vegetative-to-embryonic transition in Arabidopsis. **Plant Journal**, Oxford, v. 30, n. 3, p. 349-359, May 2002.