



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA RURAL

Ensaio com vista à indução de embriogénese
somática em oliveira (*Olea europaea* L.)

Rita Nobre Pires

Orientador: Professor Augusto António Vieira Peixe

Mestrado em Engenharia Agronómica

Dissertação

Évora, 2018

** Esta dissertação inclui as críticas e as sugestões feitas pelo júri*



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA RURAL

Ensaio com vista à indução de embriogénese
somática em oliveira (*Olea europaea* L.)

Rita Nobre Pires

Orientador: Professor Augusto António Vieira Peixe

Mestrado em Engenharia Agronómica

Dissertação

Évora, 2018

** Esta dissertação inclui as críticas e as sugestões feitas pelo júri*

“Só a educação liberta”

EPÍTETO

Agradecimentos

Em primeiro lugar, ao professor Augusto Peixe, responsável pelo laboratório de Biotecnologia e Melhoramento Vegetal da Universidade de Évora, pelo seu apoio, disponibilidade e paciência ao longo destes dois anos de trabalho.

Aos meus colegas do laboratório de biotecnologia de melhoramento vegetal e laboratório de biologia molecular pelo seu contributo e auxílio neste trabalho.

Um especial agradecimento a Vírginia Sobral, por todos os ensinamentos e apoio prestado ao longo deste trabalho.

À minha família, nomeadamente, mãe, avó e tio que me apoiaram sempre e que sem eles nada seria possível.

A Augusto Ribeiro, pela ajuda prestada durante a realização dos ensaios, e pelo companheirismo, apoio e dedicação ao longo dos anos.

RESUMO

O trabalho experimental realizado no âmbito desta dissertação teve como objetivo definir um protocolo para indução e manutenção de embriogênese somática em oliveira (*Olea europaea* L. ssp. *europaea* var. *sativa*). Para isso, utilizou-se como material inicial; - pecíolos de folhas provenientes de material em cultura *in vitro*; - estames e carpelos recolhidos em inflorescências de árvores adultas; - radículas e cotilédones provenientes de sementes maduras. Em qualquer destes casos foi utilizada a cultivar a 'Galega vulgar', sendo que, no caso dos pecíolos, o material é de natureza clonal, cl. 1441, e, no que às sementes diz respeito, foram recolhidas em árvores adultas de 'Galega vulgar' em polinização livre. Em todos os ensaios, a definição das condições de cultura, assim como dos meios nutritivos, teve em conta o trabalho realizado com sucesso por outros autores, nesta mesma espécie, inclusive nos ensaios com estames e carpelos, onde até agora não há referência a resultados positivos em oliveira. Os protocolos propostos por estes autores foram testados e os resultados obtidos avaliados e comparados com o trabalho original. Em alguns casos procedeu-se ainda a um trabalho exploratório, com alteração das variáveis em estudo, ou dos seus níveis, na expectativa de melhorar os resultados obtidos. Destes, salienta-se o seguinte; - indução de calogénese em todos os tipos de explantes utilizados; - obtenção de embriogénese somática, de uma significativa taxa de conversão dos embriões em plantas e de embriogénese repetitiva, quando o material juvenil foi utilizado; - obtenção de rebentos neoformados sobre *calli* de pecíolos. A obtenção de bons resultados com os materiais de natureza juvenil, assim como a obtenção de organogénese sobre *calli* em materiais adultos, deixa antever possibilidade de definição de um protocolo eficiente de embriogénese somática nesta cultivar, com a aplicação de ligeiras adaptações aos protocolos agora testados.

Palavras-chave: Oliveira; Embriogénese somática; Galega vulgar; Cultura *in vitro*.

Trials aiming the induction of somatic embryogenesis in olive (Olea europaea L.)

ABSTRACT

The experiments carried out for this dissertation aimed on establish a protocol for induction and maintenance of somatic embryogenesis in Olive (*Olea europaea* L. ssp. *europaea* var. *sativa*). To achieve this goal, the following start materials were used; - leaf petioles from in vitro cultured explants; - stamens and carpels collected from inflorescences of adult trees; -rootlets and cotyledons from ripe seeds. The cultivar 'Galega vulgar' was used in all trials. The petioles have a clonal origin, 'Galega vulgar' cl. 1441, and, the seeds and flowers were collected from mature trees in open pollination orchards. The culture media, as well as the culture conditions here used, always considered the successfully work reported by other authors, within the same species, including the essay with stamens and ovaries, where, to the best of our knowledge, there are no reference to positive results in Olive. The protocols proposed by these authors were tested and the achieved results evaluated and compared with the original work. In some cases, exploratory trials aiming on improve the results were also carried out, both, by changing the variables under evaluation or their levels. After data analyses, the following results may be highlighted; - callogenesis induction on all kinds of explants tested; - somatic embryogenesis, good embryo to plant conversion, and repetitive embryogenesis, when the juvenile materials were used; - shoot organogenesis over calli from petioles. The good results achieved with the materials of juvenile nature, as well as the induction of organogenesis over calli in adult materials, allow us to believe that the definition of an efficient protocol for somatic embryogenesis using mature explants of this cultivar, relies on slight adaptations to the protocols now tested.

Keywords: Olive; Somatic embryogenesis; Galega vulgar; in vitro culture.

ÍNDICE

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABELAS	xi
1. INTRODUÇÃO	11
2. EMBRIOGÉNESE SOMÁTICA EM PLANTAS	13
2.1. O que é um Embrião Somático?.....	13
2.2. Diferenças e Similaridades no Desenvolvimento dos Embriões Zigóticos e dos Embriões Somáticos	15
2.3. Origem Celular e Tipos de Embriogénese Somática	17
2.4. Fases da Embriogénese Somática	19
2.4.1. Fase de indução	19
2.4.2. Fase de expressão	20
2.4.3. Fases de Maturação e Germinação.....	21
2.5. Fatores Condicionantes da Embriogénese Somática	21
2.5.1. Fatores endógenos.....	22
2.5.2. Fatores exógenos	23
2.6. Acompanhamento Histológico do Processo de Embriogénese Somática	29
2.7. A Embriogénese Somática em Oliveira	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1. Ensaio com Radículas e Cotilédones de Embriões Zigóticos.....	34
3.1.1. Origem dos materiais e a sua preparação.....	34
3.1.2. Processo de desinfeção das sementes	35
3.1.3. Indução <i>in vitro</i>	36
3.1.4. Expressão <i>in vitro</i>	36
3.1.5. Maturação e germinação de embriões	37
3.1.6. Aclimatização	37
3.1.7. Delineamento experimental e análise de dados.....	38
3.2. Ensaio com Estames e Carpelos	39
3.2.1. Origem dos materiais e sua preparação	39
3.2.2. Processo de desinfeção e seleção dos gomos florais.....	40
3.2.3. Indução <i>In vitro</i>	41

3.2.4. Expressão <i>in vitro</i>	41
3.2.5. Delineamento experimental e análise de dados.....	42
3.3. Ensaio em Pecíolos	42
3.3.1. Origem dos materiais e sua preparação para indução <i>in vitro</i>	42
3.3.2. Indução <i>in vitro</i>	43
3.3.3. Expressão <i>in vitro</i>	44
3.3.4. Delineamento experimental e análise de dados.....	44
3.4. Condições Gerais de Trabalho.....	44
3.4.1. Preparação dos meios de cultura	44
3.4.2. Esterilização de materiais.....	45
3.4.3. Preparação de amostras para análise histológica	45
3.4.4. Registo e observação de resultados.....	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1. Ensaio com Embriões Zigóticos	50
4.1.1. Fase de indução.....	50
4.1.2. Formação de estruturas adventícias	51
4.1.2. Fase de expressão	53
4.1.3. Maturação e germinação de embriões	61
4.1.4. Aclimatização	62
4.3. Ensaio com Pecíolos de Plantas em Cultura <i>In Vitro</i>	63
4.3.1. Fase de indução.....	63
4.3.2. Fase de expressão	66
4.2. Ensaio em Estames e Carpelos	66
4.2.1. Fase de indução.....	66
4.2.1.1. Estrutura	69
4.2.2. Fase de expressão	72
5. CONCLUSÃO	75
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
ANEXO	86

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

°C – Graus Celsius

μM – Micromolar

μm – Micrómetro

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

2iP – 2-isopenteniladenina

AIB – Ácido índole-3-butírico

BA - Benziladenina

BAP – 6-Benzilaminopurina

Ca(NO₃)₂ - Nitrato de cálcio

Cm – Centímetros

Cv. – Cultivar

Cvs. - Cultivares

ECO – *Olive cyclic embryogenesis*

Fe - Ferro

G l⁻¹ – Gramas por litro

GA3 – Ácido giberélico

H – Horas

K - Potássio

KNO₃ - Nitrato de potássio

KOH – Hidróxido de Potássio

m – Metro

min. - Minuto

mm – Milímetros

mM - Milimolar

MS – Murashige e Skoog

NAA - Ácido 1-naftaleneacético

NH₄NO₃ - Nitrato de amónio

OM – *Olive medium*

OMc – *Olive Medium* com macronutrientes propostos por Bourgun & Nitsch

OMe – *Embryogenesis olive medium*

OMs – *Olive medium* modificado

S - Segundo

SH - Schenk e Hildebrandt

TDZ – Tiazurão

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida de planta com flor. Formação de óvulos e desenvolvimento da semente.

Figura 2 - Fases morfológicas dos embriões zigóticos em dicotiledóneas.

Figura 3 – Estádios de evolução dos embriões somáticos.

Figura 4 – Respostas das plantas ao *stress* ambiental.

Figura 5 - Efeito da fonte de carboidratos na embriogénese somática.

Figura 6 – Aplicação de auxina exógenas.

Figura 7 – Amostras de análise histológica.

Figura 8 - Prensa manual utilizada na remoção do endocarpo da semente (A); Endocarpo quebrado com semente no interior (B); Semente depois de removido o endocarpo (C).

Figura 9 - Interior da semente em corte transversal (A); Cotilédones (B) e Radícula (C).

Figura 10 - Cotilédones distais (A) e cotilédones proximais (B).

Figura 11 - Micrósporos na fase tétrada.

Figura 12 - Estádios dos gomos florais utilizados nos ensaios.

Figura 13 - Plantas em cultura *in vitro* da cv. 'Galega vulgar' clone 1441 (A); Folha excisada de planta (B); Pecíolo separado de planta e folha (C).

Figura 14 - Esterilizador de esferas de vidro (A); Autoclave para esterilização de meios de cultura (B).

Figura 15 - Micrótopo rotativo *MicroTec Cut4055* e placa elétrica de aquecimento *Agar Scientific*.

Figura 16 - Taxas de calogénese em função do tipo de explante inicial (LSD 95%).

Figura 17 – Explantes expostos à luz ao fim de 21 dias em meio de indução OMc suplementado com 0.5 miligramas por litro (mg l^{-1}) de 2-iP, 5 mg l^{-1} de AIB.

Figura 18 - Neoformação de raízes durante a fase de indução em função do tipo de explante e da presença ou ausência de luz.

Figura 19 - Taxas de calogénese observadas na fase de expressão, em meio OMc sem reguladores de crescimento, em função tipo de explante e das condições de cultura.

Figura 20 - Número de embriões formados em função do tipo de explante e das condições de cultura.

Figura 21 - *Calli* embriogénico de radícula (A). Ampliação da zona central do *calli* onde se evidencia a formação de uma estrutura embrionária (B).

Figura 22 - *Callus* embriogénico com embrião somático em fase globular (A) e em pormenor da zona mais externa do embrião onde se observa claramente a protoderme (B).

Figura 22 - *Callus* embriogénico com embrião somático em fase globular (A) e em pormenor da zona mais externa do embrião onde se observa claramente a protoderme (B).

Figura 23 - *Calli* de cotilédones proximais ao final de duas subculturas em meio de cultura OMc.

Figura 24 - Variação do número de embriões no final da segunda repicagem em meio ECO, em função do tipo de explante e condições de cultura.

Figura 25 – *Calli* embriogénico de radícula em condição de escuro (A;) e de cotilédone distal na condição luz (B) em meio de cultura ECO.

Figura 26 – *Callus* embriogénico de cotilédone distal com embriões em várias fases de desenvolvimento (A); Embrião isolado em fase cotiledonar (B); Plantas provenientes de embriões de radícula no escuro em meio OMc sem reguladores de crescimento (C).

Figura 27 – Desenvolvimento de embriões somáticos adventícios formados em cotilédones distais em meio ECO.

Figura 28 – Plantas em estufa provenientes de embriogénese somática. (A) Plantas após um mês a aclimatar; (B) Plantas após 6 meses de aclimatização.

Figura 29 - Taxas de calogénese em função dos meios de cultura.

Figura 30 - Variação número de rebentos obtidos em função do meio de cultura.

Figura 31 – Pecíolos ao final de duas semanas em meio de cultura OMs: (A) Pecíolo necrosado e com baixo desenvolvimento de *callus*; (B) e (C) Estruturas de primórdios foliares não expandidas.

Figura 32 – Resultados de indução em meio MS. *Callus* duro e compacto mas com formação rudimentar de rebento (A); Pequenas folhas neoformadas em *callus* de estrutura mais friável (B) e (C).

Figura 33 - Exemplos de calli contabilizados para ensaios: *Calli* em estame com origem no filete (A); *Calli* em carpelo, na base, na zona de corte (B).

Figura 34 – Intervalos de confiança para a formação de *calli* em estame, em função dos meios de cultura, temperaturas de indução e estádios de desenvolvimento.

Figura 35 - Variação da percentagem de formação de *calli* em carpelos, em função dos meios de cultura, temperatura e estádio.

Figura 36 - Exemplos dos tipos de calli observados. (A) Estame com *callus* friável em meio de cultura MS/2; B) Estame com *callus* compacto em meio de cultura OMc.

Figura 37 – Intervalos de confiança para o número de *calli* em função da estrutura e do meio de cultura.

Figura 38 - Variação da estrutura de *calli* de carpelos em função dos meios de cultura e temperaturas de indução.

Figura 39- Número de *calli* obtidos para as três cores consideradas, em função do meio de cultura em (A) Carpelos e (B) Estames. As barras de erro representam o desvio padrão da amostra.

Figura 40 - Aspeto dos calli de coloração branca obtidos em estames, correspondendo (A) a um *callus* friável e (B) a um *callus* compacto.

Figura 41 – Explantes em meio de cultura OMc sem reguladores de crescimento no final da fase de expressão: Estame pós-tétrada com temperatura de indução de 30°C (A); Carpelo pós-tétrada com temperatura de indução de 30°C (B).

Figura 42 - Explantes em meio NN sem reguladores de crescimento ao fim de 4 semanas: Estame téttrade com tratamento a 25°C (A); Carpelo téttrade com tratamento a 30°C (B).

Figura 43 – Explantes em meio MS/2 sem reguladores de crescimento no final da fase de expressão: *Calli* de carpelo pré-téttrade com indução 25° C (A); *Calli* de estame pré-téttrade com tratamento de 30°C (B).

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Embriogénese somática em oliveira

Tabela 2 - Série de soluções com concentração crescente de Butanol.

Tabela 3 - Duração dos banhos com parafina liquefeita.

Tabela 4 - Sequencia das fases do processo de coloração e respetivos tempos de contacto.

Tabela 5 - Resumo da análise de variância para a taxa de calogénese na fase de indução.

Tabela 6 - Resumo da análise de variância para a formação de estruturas adventícias.

Tabela 7 - Resumo da análise de variância para a taxa de calogénese na fase de expressão.

Tabela 8 - Valores de análise de variância para os explantes e condições de cultura.

Tabela 9 - Resumo da análise de variância para o número de embriões formados na 1ª repicagem para meio ECO.

Tabela 10 - Resumo da análise de variância para o número de embriões obtidos no final da 2ª repicagem em meio ECO.

Tabela 11 - Resumo da análise de variância para a taxa de formação de calli em pecíolos.

Tabela 12 - Valores de análise de variância em função do número de rebentos formados.

Tabela 13 - Resumo da análise de variância para a percentagem de *calli* formados nas estames.

Tabela 14 - Resumo da análise de variância para formação de *calli* em carpelos.

1. INTRODUÇÃO

A Oliveira (*Olea europaea* L.) é uma das fruteiras mais antigas e de grande relevância económica na região mediterrânea, sendo que 93% das variedades são utilizadas para a obtenção de azeite e o restante para a azeitona de mesa (Cañas e Benbadis, 1988). Podem ser encontradas duas formas de oliveira, nomeadamente a oliveira selvagem ou zambujeiro (*Olea europaea* L. ssp. *europaea* var. *sylvestris*) e a oliveira cultivada (*Olea europaea* L. ssp. *europaea* var. *sativa*) e em muitas regiões as duas formas coexistem e são compatíveis (Besnard e Bervillé, 2000; Besnard *et al.*, 2002). Atualmente existem mais de 2000 cultivares (cvs.) de oliveira na bacia do Mediterrâneo, património genético que importa preservar e cuja variabilidade constitui uma mais-valia para trabalhos de melhoramento da espécie (Chiappetta e Muzzalupo, 2012).

Até ao momento, os melhores resultados obtidos no melhoramento da oliveira resultam de processos de hibridação clássica, mas, mesmo estes, só recentemente com a utilização de novas técnicas de germinação das sementes e com a redução do período de juvenilidade (Rallo *et al.*, 2018), têm conduzido à obtenção de novas variedades com interesse agronómico, como é o caso da ‘Chiquitita’, um produto híbrido entre ‘Arbequina’ e ‘Picual’.

O desenvolvimento verificado nas técnicas de biologia molecular e de biotecnologia vegetal abrem agora novas perspetivas, tanto para apoio ao melhoramento clássico, por exemplo, na triagem precoce dos híbridos com recurso aos marcadores de ADN, como também na possibilidade de transferência direta de genes. De facto, a identificação de genes de interesse relacionados com importantes características agronómicas, por exemplo na tolerância a situações de *stress* biótico e abiótico, que durante muito tempo esteve limitada à identificação de QTLs (*Locus* de característica quantitativa), tem progredido nos últimos anos com recurso às novas técnicas de sequenciação em massa do genoma e permitiu a identificação de genes diferencialmente expressos em inúmeras situações (Rallo *et al.*, 2018).

A identificação destes genes e a possibilidade de alterar a sua regulação, abre novas perspetivas para a obtenção de cultivares melhoradas com recurso à transformação genética. Independentemente da controvérsia associada à sua utilização,

o sucesso da técnica de obtenção de organismos geneticamente modificados, passará sempre pela obtenção de protocolos consistentes de regeneração de plantas por embriogénese somática, única forma de se conseguir um OGM a partir de uma única célula.

A embriogénese somática até recentemente só era possível em algumas plantas, principalmente hortícolas e ornamentais, contudo, atualmente, já se conseguiram protocolos consistentes de embriogénese somática em várias plantas lenhosas como por exemplo o abeto da noruega (Filonovae Arnold, 2000), o castanheiro (Corredoira *et al.*, 2003), o eucalipto (Pinto *et al.*, 2002; Corredoira *et al.*, 2015) e o sobreiro (Hernández *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2013). A embriogénese somática em oliveira tem sido relatada com algum sucesso em tecidos de natureza juvenil, embriões zigóticos (imaturos e maduros), ou pecíolos foliares de plântulas (Rugini e Pesce, 2006), mas, muito poucos são os casos em que se conseguiu a partir de material adulto. Exceção são os trabalhos de Rugini e Caricato (1995) com as cultivares ‘Canino’ e ‘Moraiolo’ e de Mazri *et al.* (2011 e 2013), com a cultivar (cv.) ‘Dahbia’, onde os autores relataram a obtenção com sucesso de embriões somáticos a partir de tecidos foliares de plantas adultas.

A cultivar ‘Galega vulgar’, ainda hoje a mais representativa do olival português, apresenta um azeite de qualidade ímpar, mas simultaneamente vários problemas agronómicos, que têm conduzido a um cada vez maior desinteresse dos produtores na sua utilização. Por isso mesmo, esta cultivar é uma forte candidata a trabalho de melhoramento com base na aplicação das novas tecnologias anteriormente referidas. O objetivo deste estudo foi dar um primeiro passo nesse sentido, procurando obter um protocolo de embriogénese somática eficaz, a partir de explantes recolhidos em génotipos selecionados, que pudesse posteriormente vir a ser utilizado em trabalhos de transformação genética da cultivar.

Conscientes das dificuldades encontradas em trabalhos idênticos com outras cultivares, para além de explantes adultos, recolhidos diretamente em plantas de campo, ou em plantas já em cultivo *in vitro*, utilizaram-se também nos ensaios explantes de natureza juvenil (embriões e cotilédones). Estes, ainda que apresentando pouco interesse para o objetivo pretendido, poderão, no caso de ser os únicos onde se venha a obter sucesso, dar algumas pistas no sentido de se encontrar a formulação adequada dos meios de cultura para a indução da embriogénese somática em materiais adultos.

2. EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM PLANTAS

2.1. O que é um Embrião Somático?

O ciclo de vida das plantas superiores (Figura 1) alterna entre estruturas celulares haploides (geração gametófito) e diploides (geração esporófito). A geração gametófito inicia-se, como o próprio nome indica, com a formação dos gametófitos, masculino (grãos de pólen) e feminino (óvulos), nos quais, através da evolução da micro e megasporogênese, se formam respectivamente os gâmetas masculinos (anterozoides), e femininos (oosfera) (Reiser e Fischer, 1993). A geração diploide ou geração esporófito inicia-se após a fecundação da oosfera por um dos anterozoides, num processo que dá origem à formação do ovo ou zigoto. Esta nova entidade, a partir de uma série de divisões organizadas e da subsequente especialização celular, dá origem a um embrião (Goldberg, 1988).

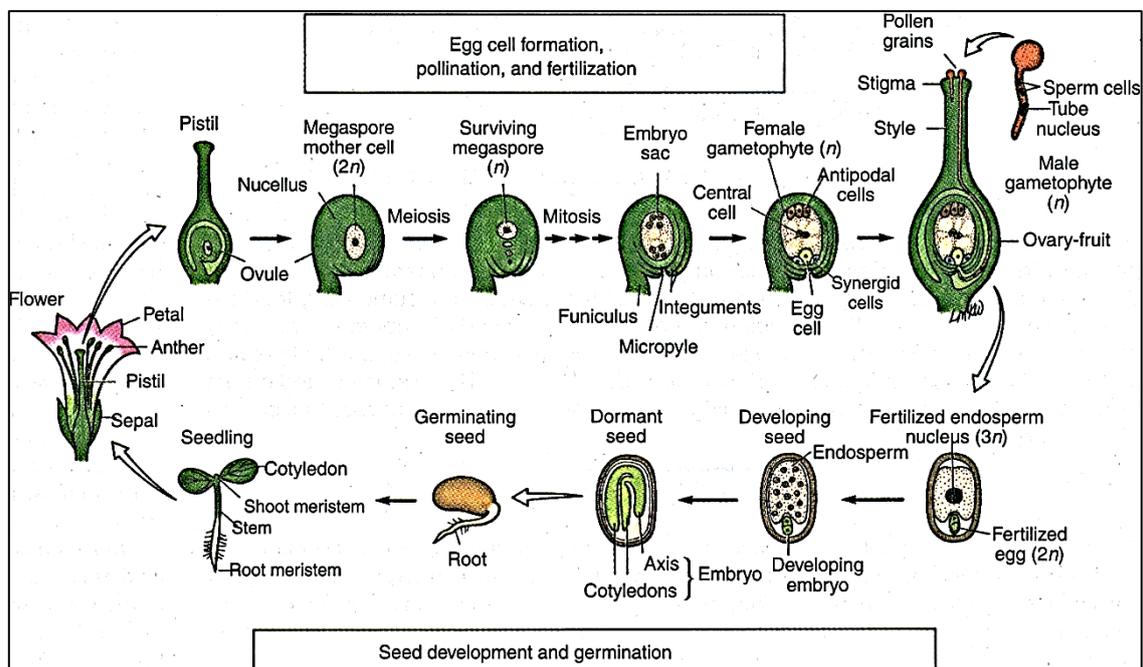


Figura 1 - Ciclo de vida de planta com flor. Formação do gametófito feminino, polinização e fecundação, desenvolvimento e germinação da semente. Adaptado de Goldberg (1988).

Contudo, a oosfera não é a única célula com capacidade para produzir um embrião, na natureza, outras células, haploides ou diploides do saco embrionário,

podem estar envolvidas na formação de estruturas análogas aos embriões zigóticos, num processo conhecido como poliembrionia adventícia (haplo/diploide) (Floh *et al.*, 2015). Este processo, que ocorre com alguma frequência em determinadas espécies vegetais, como por exemplo nos citrinos, é descrito como a capacidade de iniciação e desenvolvimento de embriões provenientes de células que não são o produto direto da fusão dos gâmetas, e, quando estes embriões resultam da evolução de células do tecido nuclear, eles são clones da planta original (Janick, 1993). Um processo semelhante pode ser conseguido em condições artificiais, com a formação *in vitro* de embriões a partir de células dos tecidos somáticos, e, como o próprio nome indica, recebe o nome de embriogénese somática (Canhoto, 2010). Neste caso, tal como na poliembrionia nuclear, as células desenvolvem-se numa sequência de diferentes fases embriogénicas, originando plantas completas (Baptista, 2012), sendo cada nova planta assim originada teoricamente igual à planta original (Fernández, 2002).

A embriogénese somática em condições artificiais foi conseguida pela primeira vez por Reinert (1958) e por Steward *et al.* (1958), em cenoura (*Daucus carota* L.), através de cultura de células em suspensão (Anami *et al.*, 2013), e em *Datura inóxia* Mill (Guha e Maheswari, 1964), com a indução de embriões somáticos a partir de células generativas (micrósporos).

Em qualquer caso, para que se inicie a formação de embriões somáticos, células diferenciadas precisam de reorganizar os seus padrões fisiológicos e metabólicos, num processo que vulgarmente se conhece por desdiferenciação celular. Estas células readquirem assim competência embriogénica após a reativação dos seus ciclos de divisão celular (Fehér *et al.*, 2003). A embriogénese somática pode, portanto, considerar-se como o exemplo mais extraordinário da totipotência das células vegetais (Karami *et al.*, 2009).

2.2. Diferenças e Similaridades no Desenvolvimento dos Embriões Zigóticos e dos Embriões Somáticos

O desenvolvimento dos embriões somáticos em dicotiledóneas assemelha-se bastante ao desenvolvimento dos embriões zigóticos, tanto morfológica, como temporalmente. Inicialmente, caracterizam-se ambos pela diferenciação de uma estrutura bipolar, constituída de ápice caulinar e radicular (Guerra *et al.*, 1999).

Canhoto (2010) refere que, desde a primeira divisão do zigoto até à maturação, um embrião zigótico passa por 5 fases morfológicas distintas: Fase Pré-Globular (a), Fase globular (b), Fase cordiforme (c), Fase torpedo (d) e Fase cotiledonar (e). O mesmo autor refere as principais características de cada uma destas fases, que se apresentam de seguida e estão ilustradas na figura 2.

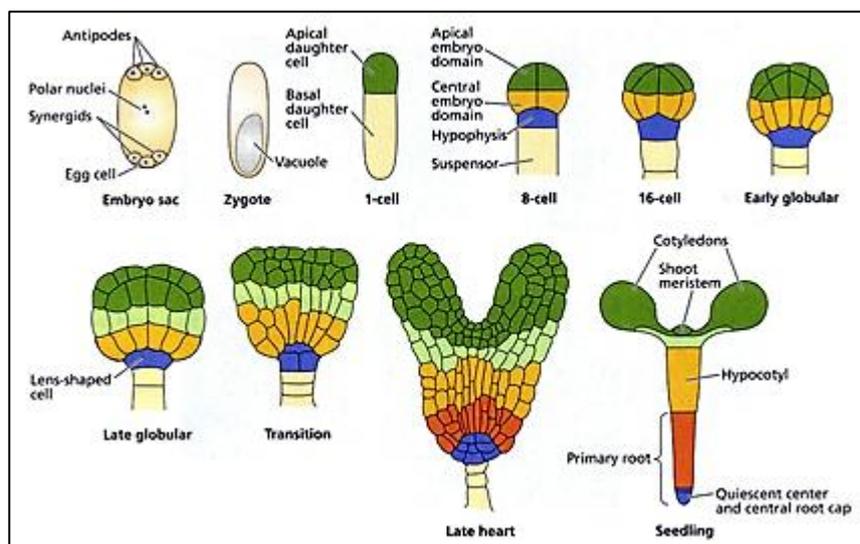


Figura 2- Fases morfológicas dos embriões zigóticos em dicotiledóneas. Adaptado de Ördög (2011).

a) Fase Pré – Globular

Ocorre desde a primeira divisão do zigoto até à diferenciação da protoderme. Esta primeira divisão é assimétrica e origina duas células, apical e basal, sendo que a primeira origina o embrião propriamente dito e a segunda forma o suspensor. Esta é a estrutura que liga o embrião aos tecidos maternos durante as fases iniciais do seu desenvolvimento e auxilia na produção e/ou transporte

de hormonas. Nas fases mais avançadas, o suspensor sofre um processo de morte celular programada e degenera.

b) Fase Globular

O embrião é agora formado por uma massa compacta de células, de forma esférica e simetria radial, caracterizando-se por uma intensa atividade mitótica. A metade superior do embrião originará os órgãos aéreos da planta, enquanto a metade inferior formará a parte radicular.

c) Fase Cordiforme

Devido a um mecanismo de transporte polar de auxina, ocorre a acumulação deste regulador de crescimento em zonas bem definidas do embrião, que mais tarde se diferenciam em cotilédones. Este processo reflete a diferenciação apical-basal que ocorre durante o desenvolvimento do embrião e que permite a formação de diferentes órgãos embrionários, tais como: os cotilédones, o meristema apical do caule (MAC), o eixo hipocótilo-raiz e o meristema apical da raiz (MAR). Os dois meristemas começam a organizar-se e ocorre ao mesmo tempo a diferenciação radial de tecidos como a protoderme, meristema fundamental e procâmbio, passando o embrião nesta fase de uma simetria bilateral para uma simetria radial.

d) Fase Torpedo

Nesta fase os meristemas apicais já se encontram totalmente formados, o embrião alonga-se e acentua-se a diferenciação dos cotilédones. As células do embrião começam a acumular reservas e o suspensor degenera.

e) Fase Cotiledonar

Os cotilédones estão completamente desenvolvidos e as células do embrião preenchidas com substâncias de reserva. Esta é a última fase do desenvolvimento embrionário tendo o embrião completado o seu processo de morfogénese.

Ainda segundo Canhoto (2010), em muitas espécies o embrião entra então numa fase de dormência que depois de quebrada e na existência das condições adequadas permite a sua germinação, dando origem a uma plântula, que prosseguirá a sua evolução através da atividade dos meristemas apicais do caule e da raiz.

Tal como os embriões zigóticos, também os embriões somáticos (Figura 3) são estruturas bipolares desde o início do seu desenvolvimento, contudo não possuem conexão vascular com o tecido materno, o que permite distingui-los dos primeiros e também fazer a discriminação entre a embriogénese somática e a regeneração de rebentos adventícios (Fernández, 2002; Winkelmann, 2016).

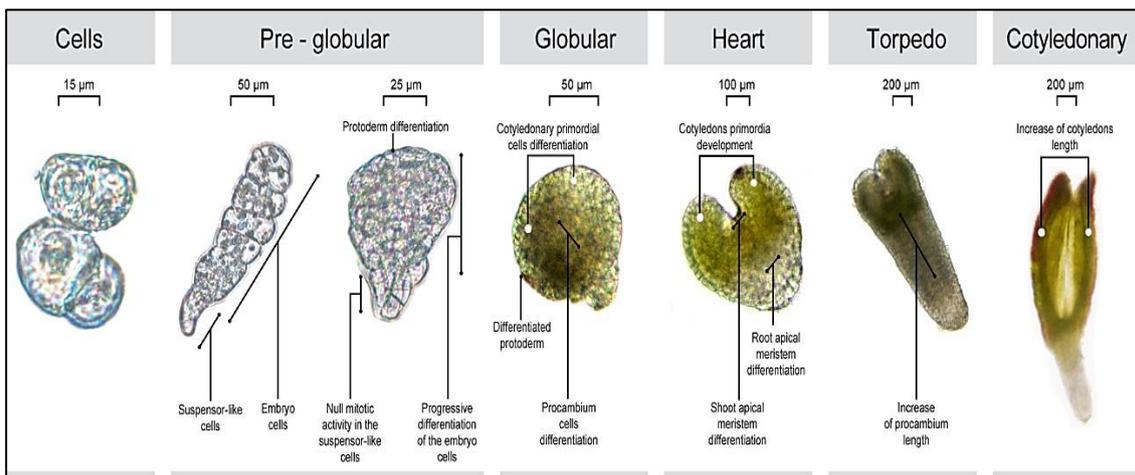


Figura 3 - Estádios de evolução dos embriões somáticos. Adaptado de Frederico *et al.* (2009).

Apesar do conteúdo hormonal dos meios de cultura poder de alguma forma simular os sinais naturais necessários para o início da embriogénese, a morfologia e o tamanho dos vários estágios embriogénicos são completamente intrínsecos ao programa embriogénico, não sendo controlados por nenhuma informação ambiental ou limitações espaciais (Zimmerman, 1993). Também Fehér (2015), refere que os embriões formados *in vitro* são frequentemente maiores e formados por um maior número de células, com uma superfície menos organizada.

2.3. Origem Celular e Tipos de Embriogénese Somática

Os embriões somáticos podem ter origem numa célula única, ou ser o resultado da proliferação de um grupo de células que se diferenciam numa estrutura organizada (Williams e Maheswaran, 1986; Yeung, 1995). Os embriões originados de uma célula única apresentam geralmente um padrão ordenado de divisão celular durante o seu

desenvolvimento, o que facilita a compreensão da sucessão de acontecimentos celulares que ocorrem durante o processo embriogénico (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006).

Por outro lado, os embriões que tenham uma origem multicelular mostram um padrão de divisão mais complexo. Segundo Zimmerman (1993), tanto do ponto de vista da sua morfologia como da sua evolução, desde a fase globular à fase torpedo, os embriões somáticos e zigóticos são bastante similares. Já em fases mais avançadas do seu desenvolvimento, verifica-se que nos embriões somáticos não ocorre a dessecação característica dos embriões zigóticos, podendo assim evoluir diretamente para plântulas completamente diferenciadas, ainda que em muitos casos também se verifique a presença de dormência fisiológica.

Independentemente da sua origem uni ou multicelular, os embriões somáticos podem surgir diretamente sobre o explante inicial (**embriogénese somática direta**) ou formar-se sobre um *callus* previamente evoluído (**embriogénese somática indireta**).

A embriogénese somática direta ocorre quando os explantes sofrem poucas divisões celulares antes da indução embriogénica. Já a embriogénese somática indireta acontece quando os explantes passam por um período longo de proliferação desorganizada, na forma de *calli*, antes da formação dos embriões somáticos (Sharp *et al.*, 1980, *cit. in* Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006).

Williams e Maheswaran (1986) sugeriram que na embriogénese somática direta as células proembrionárias competentes já estão previamente formadas e a expressão do programa embriogénico depende meramente das condições favoráveis do meio, sendo necessária uma reprogramação mínima para o desencadear do processo.

Por sua vez, na embriogénese somática indireta, para se obter o estado embriogénico é necessária a reprogramação prévia de uma célula, para que ocorra desdiferenciação e reaquisição da condição merismática primária (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006). Assim, esta forma de embriogénese é considerada como uma característica dos explantes derivados de tecidos mais diferenciados, ou maduros, nos quais as células devem passar por vários ciclos antes de adquirir a condição embriogénica (Guerra *et al.*, 1999).

Existem também espécies em que os embriões somáticos produzidos têm capacidade de iniciar ciclos de embriogénese repetitiva, formando novos embriões somáticos. A este tipo de embriogénese dá-se o nome de embriogénese secundária,

cíclica, ou recorrente, e pode manter-se durante vários anos, originando um elevado número de plantas (Canhoto, 2010).

As diferenças principais entre as várias vias embriogénicas encontram-se sobretudo na fase de indução, sendo que não é uma competência celular o desencadear do desenvolvimento embrionário, a resposta é controlada por um conjunto de fatores hormonais e ambientais que levam as células a reverter a um estado de desenvolvimento anterior e a recuperar a sua totipotência (Fehér, 2015).

2.4. Fases da Embriogénese Somática

Parrot (1993) refere que o desenvolvimento de um sistema experimental para a regeneração de plantas via embriogénese somática inclui as seguintes fases: **indução**, **proliferação/expressão**, **maturação** e **germinação**. Em algumas espécies todas estas fases acontecem num único meio de cultura (*one-step embryogenesis*), enquanto noutras, como acontece na maior parte das gimnospermas, é necessária a utilização de diferentes meios de cultura para se conseguir a regeneração de plantas (Krit Raemakers *et al.*, 1999).

2.4.1. Fase de indução

A indução embriogénica consiste na alteração do programa genético existente em células do tecido que constitui o explante, por outro programa genético de expressão embriogénica, sendo que, com esta substituição, as células são induzidas a produzir embriões somáticos (Caeiro, 1999).

Para Sugiyama (1999) e Elhti (2010), existem três componentes essenciais para o sucesso da indução embriogénica: primeiro, as células no interior do explante devem possuir o potencial para expressar a sua totipotência; segundo, as células devem ser competentes para responder a sinais exógenos; terceiro, as células competentes devem ser induzidas por sinais específicos (geralmente reguladores de crescimento) e tornarem-se comprometidas com a via embriogénica.

Apesar dos avanços verificados, ainda é limitada a compreensão dos estímulos e das condições necessárias para o desencadear processo de indução embriogénica. A

possibilidade de se conseguir a sua manipulação para fins tecnológicos, depende do domínio preciso de princípios de fisiologia do desenvolvimento (Guerra *et al.*, 1999). É pois fundamental compreender, de forma integrada, os processos que influenciam a determinação celular, ou seja, a forma pela qual o potencial de desenvolvimento de uma célula se torna limitado a um percurso específico (Christianson, 1985). Inicialmente existe uma alteração no programa genético das células do explante, possivelmente por um mecanismo de metilação do ADN e por uma rotura da integridade dos tecidos, resultando assim num isolamento de células ou de grupos de células, que, uma vez isolados, ficam livres da influência dos tecidos que as envolviam, sendo mais facilmente estimuladas a desencadear o processo embriogénico (Smith e Krikorian, 1990).

Deste modo, para Guerra *et al.* (1999) a epigénese é o resultado da ativação seletiva e diferencial de genes (reprogramação celular), que envolve células ou tecidos recetivos. Exemplos disso nas plantas são a transição da fase juvenil para a fase adulta, a camada de abscisão em pecíolos de folhas e a camada epidérmica de explantes embrionários.

Os sinais de competência indutora e o desencadeamento do desenvolvimento embriogénico não são fáceis de separar (Zavattieri *et al.*, 2010), uma vez que a competência celular está associada à desdiferenciação de células somáticas que lhes permite responder a novos sinais de desenvolvimento (Potters *et al.*, 2007).

2.4.2. Fase de expressão

No final da fase de indução, as estruturas pré-embriogénicas produzidas a partir do explante primário, começam a proliferar e desenvolvem-se em culturas embriogénicas (Arnold *et al.*, 1995). A forma como as culturas proliferam ainda não é conhecida com detalhe, contudo, a fase de expressão pode suceder de diferentes formas segundo von Arnold e Hakman (1988): (1) Os embriões somáticos podem surgir através de um mecanismo semelhante à clivagem poliembriogénica, com a separação inicial ocorrendo na região embrionária; (2) Os embriões somáticos podem desenvolver-se a partir de pequenas células meristemáticas no interior do suspensor, sendo que estas células iniciais podem surgir por divisão assimétrica de células suspensoras ou de células meristemáticas da região embrionária que não se conseguiram alongar

enquanto se integravam no suspensor; (3) Os embriões somáticos podem surgir de células únicas ou de pequenos agregados de células a partir de uma divisão assimétrica que limita a região embriogênica e a região do suspensor.

2.4.3. Fases de Maturação e Germinação

Bewley e Black (1985) referem que a fase de maturação se caracteriza pela ocorrência de alongamento celular sem divisão, correspondendo ao período de desenvolvimento do embrião somático onde ocorre a expansão celular e a acumulação de substâncias de reserva.

No que respeita à fase de germinação, Fernández (2002), descreve-a como sendo o processo de alongamento e reativação metabólica de um embrião somático maduro, para a sua conversão em plântula.

Como referido por Canhoto *et al.* (1999), muitos fatores podem influenciar estas duas fases, especialmente o tipo e a concentração de reguladores de crescimento. Segundo estes autores, a regeneração de plantas é normalmente favorecida pela utilização de meios de cultura sem a presença de auxinas, ou com uma baixa concentração destas. Ocasionalmente, meios com citocininas ou ácido giberélico (GA₃) também permitiram a regeneração de plantas.

Também Ishii *et al.* (1999), trabalhando com *Quercus serrata* L., referem que a aplicação da citocinina 6-benziladenina (BA) numa concentração elevada, ou de zeatina, independentemente da concentração desta última, conduziu a efeitos negativos no alongamento dos rebentos induzidos ficando estes inchados e vitrificados.

A morfologia dos embriões também determina o sucesso da sua conversão em plantas, justificando-se a prévia seleção de embriões considerados como normais, de forma a otimizar a sua germinação (Hay e Charest, 1999).

2.5. Fatores Condicionantes da Embriogénese Somática

A capacidade de alterar o padrão de desenvolvimento celular da via vegetativa para a via embriogénica e assim gerar embriões somáticos, é restrito a um pequeno grupo de células. Essas células, por sua vez, podem ser influenciadas por vários fatores

endógenos (genótipo da planta, origem dos explantes e seu estado fisiológico) e exógenos (composição do meio de cultura, condições de cultura) (Nic-Can *et al.*, 2016).

2.5.1. Fatores endógenos

2.5.1.1. Genótipo

Nas espécies fruteiras, tanto a indução de *calli* como de embriões está dependente do genótipo (Zhang e Lespinasse, 1992; Canhoto, 2010). O genótipo das plantas é um dos fatores que mais influencia a indução embriogênica, uma vez que, genótipos individuais dentro da mesma espécie variam muito no que se refere à capacidade embriogênica, de tal forma que podem refletir diferenças correntes na capacidade de ativar elementos-chave para o desenvolvimento da via embriogênica (Parrott *et al.*, 1991). Assim, os genótipos individuais são requisitos únicos para melhorar a capacidade de regeneração das plantas (Merkle, 1990).

2.5.1.2. Tipo e idade do explante

No geral, quase todas as partes da planta podem ser usadas na indução da embriogênese somática: ápices caulinares (Chee e Cantliffe, 1988; Cantliffe *et al.*, 1992), hipocótilos (Halperin, 1966), discos foliares (Sondahl e Sharp, 1977), segmentos foliares (Rabéchault *et al.*, 1970; Ahée *et al.*, 1981), inflorescências (Chu *et al.*, 1984), ou raízes (Okamura *et al.*, 1973).

As características dos explantes colocados em cultura, mais concretamente a sua idade, determinam a capacidade embriogênica (Mazri *et al.* 2011).

Raemakers *et al.* (1999), referem que nos explantes juvenis os genes para a embriogênese zigótica estão mais ativos, e, conseqüentemente, as células desses tecidos podem mais facilmente desenvolver embriogênese somática, enquanto nos tecidos numa fase muito avançada do seu desenvolvimento, torna-se mais difícil a aquisição desta competência. Nas espécies lenhosas, os embriões zigóticos são os explantes mais utilizados para indução da embriogênese somática e normalmente os

embriões zigóticos imaturos apresentam uma competência embriogénica mais elevada do que os embriões zigóticos maduros (Tulecke e Mcgranahan, 1985; Long *et al.*, 1995).

2.5.2. Fatores exógenos

Os fatores exógenos são os principais responsáveis pela criação do *stress* necessário para que ocorra a formação de embriões somáticos em cultura *in vitro*. Segundo Larcher (1980) *cit. in* Kevers *et al.* (2004), o *stress* provoca uma alteração na fisiologia da planta, que resulta da sua exposição a condições desfavoráveis. Estas, não precisam de representar uma ameaça à vida, mas induzem uma resposta de alarme defensiva ou adaptativa.

Na preparação e inoculação *in vitro* dos explantes, para desenvolver um processo de embriogénese somática, os tecidos são sujeitos a vários agentes, tanto mecânicos como químicos (Nic-Can *et al.*, 2016), responsáveis pela criação das condições de *stress* atrás referidas. Exemplos disso são; - o *stress* causado pela desinfecção inicial aquando da instalação da cultura; - os ferimentos provocados aquando da excisão do explante no tecido original; - o *stress* oxidativo durante a manipulação; - os reguladores de crescimento e o potencial osmótico do meio de cultura; - as condições de cultura, temperatura, luz e fotoperíodo (Zavattieri *et al.*, 2010).

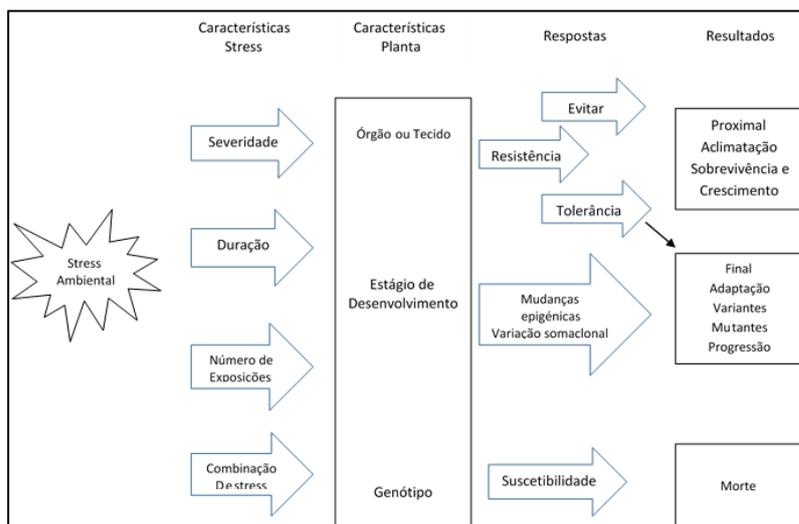


Figura 4 - Respostas das plantas ao *stress* ambiental em correspondência com o *stress* e características da planta. Adaptado de Gaspar *et al.* (2002).

A duração, a severidade e a intensidade em que um *stress* é imposto, influencia a resposta dos explantes (Figura 4). Várias condições adversas em combinação, podem

provocar respostas diferentes das obtidas quando existe um único fator de *stress* (Gaspar *et al.*, 2002).

2.5.2.1. Composição dos meios de cultura

2.5.2.1.1. Composição mineral

A composição mineral do meio, e em particular o tipo de azoto utilizado, têm uma influência significativa na indução e desenvolvimento de embriões somáticos.

Os meios de cultura que apresentam concentrações iónicas elevadas, como os meios Murashige e Skoog (MS) (Murashige e Skoog, 1962), Schenk e Hildebrandt (SH), (Schenk e Hildebrandt, 1972), ou o meio B5, desenvolvido por Gamborg *et al.* (1968), têm demonstrado resultados favoráveis no crescimento e desenvolvimento de embriões somáticos. Ammirato e Steward (1971) referem que estruturas proembrionárias apresentam um melhor desenvolvimento nesses meios de cultura quando comparados com o desenvolvimento em meios de cultura com baixa concentração iónica, como sucede com o meio de White (White, 1943).

Relativamente ao tipo de azoto, Halperin e Wetherell (1965), trabalhando com cenoura, referem que o azoto amoniacal é essencial para o desenvolvimento de proembriões e que na ausência deste composto não se verificou a formação de embriões somáticos. Em trabalhos com a mesma espécie, Reinert *et al.* (1967), referem que a quantidade de azoto no meio de cultura é mais importante do que a forma do ião, observando-se a formação de embriões tanto na presença de nitrato de potássio (KNO_3) como de nitrato de amónio (NH_4NO_3). Em outros estudos, Ammirato (1983) e Gleddie *et al.* (1983), referem que a adição simultânea de compostos azotados na forma amoniacal e nítrica, tem um efeito estimulante no desenvolvimento de embriões somáticos.

Outros componentes presentes nos meios de cultura que também influenciam o processo de embriogénese são o potássio (K), o cálcio (Ca) e o ferro (Fe).

O potássio é um nutriente fundamental para o processo da embriogénese somática. Brown *et al.* (1976) demonstraram nos seus ensaios em cultura de células de

cenoura, que o número de embriões produzidos se correlaciona com o aumento da concentração de K no meio de cultura.

Relativamente ao cálcio, Tazawa e Reinert (1969) observaram que a adição de 28.4 mM (milimolar) de nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) no meio de cultura inibe a embriogénese somática.

Quanto ao ferro, Havranek e Vagera (1979) constataram que o desenvolvimento normal de embriões em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) só ocorreu na presença de Fe no meio de cultura. Também Ammirato (1983) refere que o desenvolvimento de embriões após a fase globular foi inibido em meios de cultura desprovidos deste elemento. De um modo geral, recomenda-se a utilização de ferro na forma de quelato em meios de cultura para indução de embriogénese somática, devido à sua mais fácil absorção pelas células.

2.5.2.1.2. Fontes de carbono

Vários autores (Lazzeri *et al.*, 1988; Leva e Sink, 1990) afirmam que os carboidratos possuem um duplo papel atuando como uma fonte de carbono e osmótica.

A sacarose é a fonte de carbono mais utilizada na embriogénese somática, embora outros monos e dissacarídeos possam ser utilizados (Guerra *et al.*, 1999). A concentração de sacarose influencia os processos de iniciação e diferenciação dos embriões somáticos, uma vez que o seu metabolismo nas plantas é regulado por um grupo de enzimas (sacarose sintase e sacarose invertase) cujas respostas são modeladas de acordo com a variação da sua concentração (Koch *et al.*, 1995).

Para a indução da embriogénese somática é comum a utilização de 3% de sacarose nos meios de cultura (Canhoto *et al.*, 1999), porém outras fontes de açúcar como a maltose, glucose, frutose, entre outras, podem também ser utilizadas na indução de embriões (Leva e Sink, 1990; Canhoto e Cruz, 1994; Cheong e Pooler, 2004.).

Canhoto *et al.* (1999) testaram a concentração para cada tipo de açúcar (0.25M de maltose, 0.3M sacarose, 0.4M glucose e 0.4M frutose) resultando na diferenciação de embriões somáticos em mais de 90% dos explantes, constatando-se porém que o número de embriões somáticos obtidos por explantes embriogénicos foi mais alto quando se utilizou 0.3M de sacarose. Já Lazzeri *et al.* (1988) verificou que as

concentrações de sacarose e de auxina utilizadas nos meios de cultura interagem entre si sendo que a concentração ótima a aplicar está dependente uma da outra.

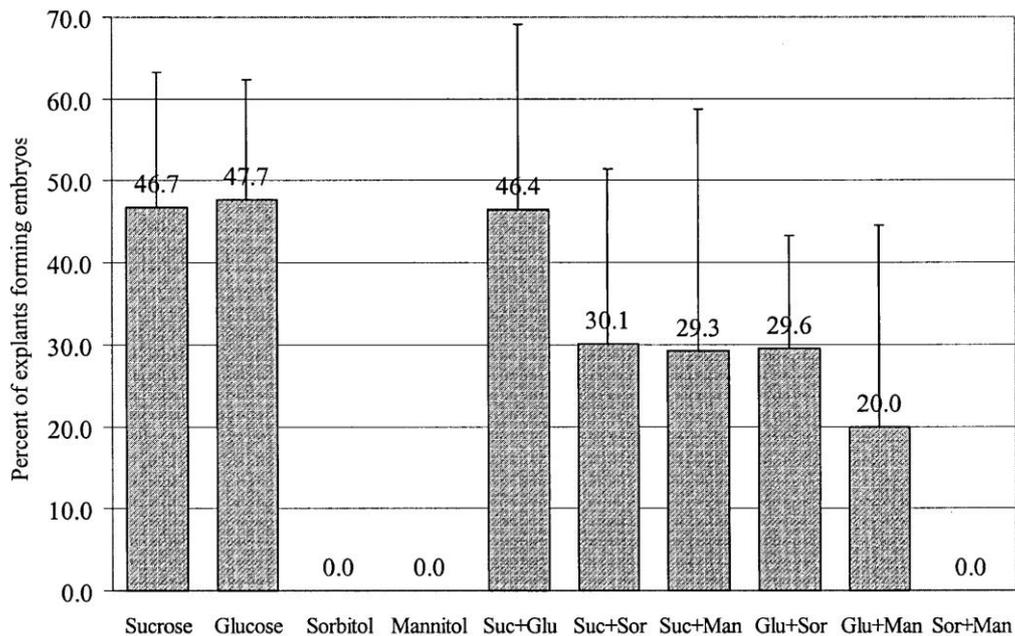


Figura 5 - Efeito da fonte de carboidratos na embriogênese somática. Meios de cultura suplementados com 3% de sacarose, glicose, sorbitol, manitol ou com ambas as combinações indicadas com uma concentração de 1,5%. Adaptado de Cheong e Pooler (2004).

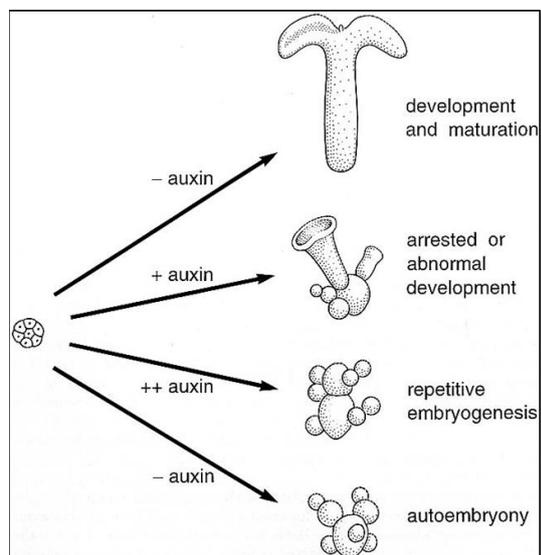
Também Cheong e Pooler (2004) testaram a aplicação de várias fontes de açúcar nos meios de cultura (Figura 5) na obtenção de embriões em *Prunus incisa* cv. 'February Pink' e concluíram que não se desenvolveram embriões somáticos em meios de cultura que continham unicamente sorbitol ou manitol como fonte de carbono. Por outro lado, aproximadamente 50% dos explantes desenvolveram embriões somáticos em meios contendo sacarose ou glicose. A capacidade embriogênica decresceu em meios suplementados com ambos os tipos de açúcar. A maioria dos explantes em meios de cultura contendo sacarose e glicose formaram *calli* e raízes após 2 semanas em cultura. Contudo, explantes cultivados em meios contendo apenas sorbitol como fonte de carbono, produziram somente *calli*, e explantes cultivados em meios contendo só manitol, não formaram *calli* ou raízes.

2.5.2.1.3. Reguladores de crescimento

A adição de reguladores de crescimento exógenos aos meios de cultura, especialmente a aplicação de auxinas, tem um papel fundamental na indução e desenvolvimento de embriões somáticos. As auxinas são consideradas indutores chave no desenvolvimento embriogénico das células somáticas cultivadas *in vitro*, contudo, apenas uma fração das células tem capacidade de resposta embriogénica, sendo a diferença na sensibilidade à auxina indicada como um fator limitante na interação complexa entre células e reguladores de crescimento sintéticos (Dudits *et al.*, 1991).

Canhoto *et al.* (2010) referem que a combinação dos reguladores de crescimento 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e BAP (6-benzilaminopurina) originaram um resultado favorável na resposta embriogénica. Também Dunstan *et al.* (1995) e Kendurkar *et al.* (1995) sugeriram que a embriogénese somática em plantas lenhosas é muitas vezes atingida na presença de uma única auxina (2,4-D na maioria dos casos) ou em combinação com uma citocinina. Contudo o tipo e concentração de auxina influencia bastante, tanto as frequências de indução, como o número de embriões obtidos por explante (Canhoto *et al.*, 1999).

Figura 6 – Respostas à aplicação de auxina exógena durante a histodiferenciação. Quando a auxina é retirada do meio de cultura ocorre um desenvolvimento e maturação normal do embrião. A presença de auxina no meio de cultura pode causar a interrupção do processo de histodiferenciação quando o embrião se encontra no estágio globular ou coração. Se a concentração de auxina for elevada pode conduzir à embriogénese repetitiva. Finalmente a embriogénese repetitiva pode suceder mesmo na ausência de auxinas exógenas sendo este processo denominado de “autoembrionia”. Adaptado de Merkle *et al.* (1995).



A indução de embriões somáticos acontece normalmente num procedimento de “dois passos”, isto é, recorrendo a dois meios de cultura diferentes. Este processo foi relatado em espécies como *Eucalyptus citriodora* H. e *Eucalyptus dunnii* M. (Muralidharan *et al.*, 1991 e Termignoni *et al.*, 1996 cit. in Canhoto *et al.*, 1999), onde,

para promover a regeneração de plantas, os *calli* embriogénicos foram transferidos de um meio rico em auxinas para um meio sem reguladores de crescimento.

Merkle *et al.* (1995) referem que a aplicação de auxinas exógenas durante a diferenciação celular pode conduzir a resultados distintos. Na figura 6, observa-se o comportamento dos explantes em função do seu estágio de evolução e da concentração de auxina utilizada. Estes autores concluíram que, quando a auxina é retirada do meio de cultura ocorre o desenvolvimento de estruturas embrionárias, em contraste, a sua presença continuada pode interromper o processo de diferenciação, quando os embriões se encontram na fase globular ou de coração. Porém, se a concentração de auxina for elevada nesta fase, ela pode conduzir a uma embriogénese repetitiva embora este tipo de embriogénese se possa desenvolver também num meio de cultura sem a presença de auxinas, processo denominado de “autoembrionia”.

2.5.2.2. Condições de cultura

2.5.2.2.1. Luz e Temperatura

A luz é conhecida por afetar a embriogénese somática através do seu efeito na fase de indução e em algumas características morfológicas como a diferenciação de embriões somáticos (Verhagen e Wann, 1989). Embora há muito seja conhecido o efeito estimulante da luz na germinação precoce de embriões, alguns autores não o consideram crítico para o desenvolvimento de embriões somáticos (Narayanaswamy e Norstog, 1964).

Algumas plantas respondem melhor a condições de obscuridade e outras requerem luz para se dar o desenvolvimento embriogénico (Gleddie *et al.*, 1983; Hu e Wang, 1986; Hay e Charest, 1999; Canhoto, 2010). Por exemplo, no abeto da Noruega, a embriogénese somática só é possível na completa obscuridade e se existir amónio no meio de cultura (Merkle, 1995). Na oliveira, Rugini e Caricato (1995) referiram que a luz parece inibir a embriogénese somática, e, Rugini (1988), com a utilização de discos de folhas como material de partida, referiu que se produziram mais *calli* no escuro do que na luz.

Relativamente à temperatura, Husaini *et al.* (2001) nos seus ensaios na cultura do morango, referem que temperaturas muito altas ou demasiado baixas, que provoquem *stress* no explante, estimulam o desenvolvimento de embriões somáticos.

2.5.2.2.2. Fotoperíodo

O fotoperíodo tem sido relacionado com a regulação dos níveis de citocinina, contudo, a resposta ao fotoperíodo, pode ser afetada por outros fatores ambientais, como a temperatura. Husaini e Abdin (2007) demonstraram que os explantes sujeitos a um tratamento de frio e com fotoperíodo ótimo de 12 horas (h) em vez de 16h, obtinham melhores resultados. No caso da 'Canola', uma variedade de colza, temperaturas elevadas durante a indução de embriões de pólen aumentou o potencial embriogénico enquanto o frio provocou melhores resultados na cultura do morango (Husaini e Abdin, 2007).

2.6. Acompanhamento Histológico do Processo de Embriogénese Somática

Dunstan *et al.* (1995), em estudos sobre embriogénese somática em plantas lenhosas, sugerem que a indução da embriogénese somática deveria ser complementada por estudos anatómicos, sendo este tipo de análise útil para três propósitos: 1) Para confirmar que as estruturas formadas são de facto embriões e não rebentos provenientes do processo de organogénese; 2) porque permite distinguir entre embriões originados de uma célula única ou de múltiplas células, uma vez que só embriões com origem numa única célula são histologicamente uniformes; e 3) para determinar quais as células num explante que são responsáveis pela formação de embriões somáticos, tornando mais fácil isolar e caracterizar as células embriogénicas ao nível bioquímico.

Como a seguir se descreve, a análise histológica permitiu a Benelli *et al.* (2015) estudarem a origem e o crescimento proembrionário, a diferenciação tecidular, a localização e a ocorrência de amido durante a formação de embriões de oliveira na cv. 'Canino'.

No trabalho realizado por estes autores, a primeira evidência observada de alterações no explante original foi a ocorrência de divisões celulares na epiderme dos explantes (Figura 7 - A), e, após uma semana, detetou-se um início de atividade nas células subepidérmicas (Figura 7 - B). Duas a três semanas depois, no seios destes focos meristemáticos iniciais, surgiram os primeiros embriões globulares, com um número variável de células (Figura 7 - C). No final da fase globular, foi possível observar no centro da estrutura, a formação de um anel de células com vacúolos menores e um citoplasma mais proeminente (Figura 7 - D). Este anel de células rapidamente se transformou num cilindro central com a evolução do embrião de globular para cordiforme e posteriormente para torpeda (Figura 7 - E).

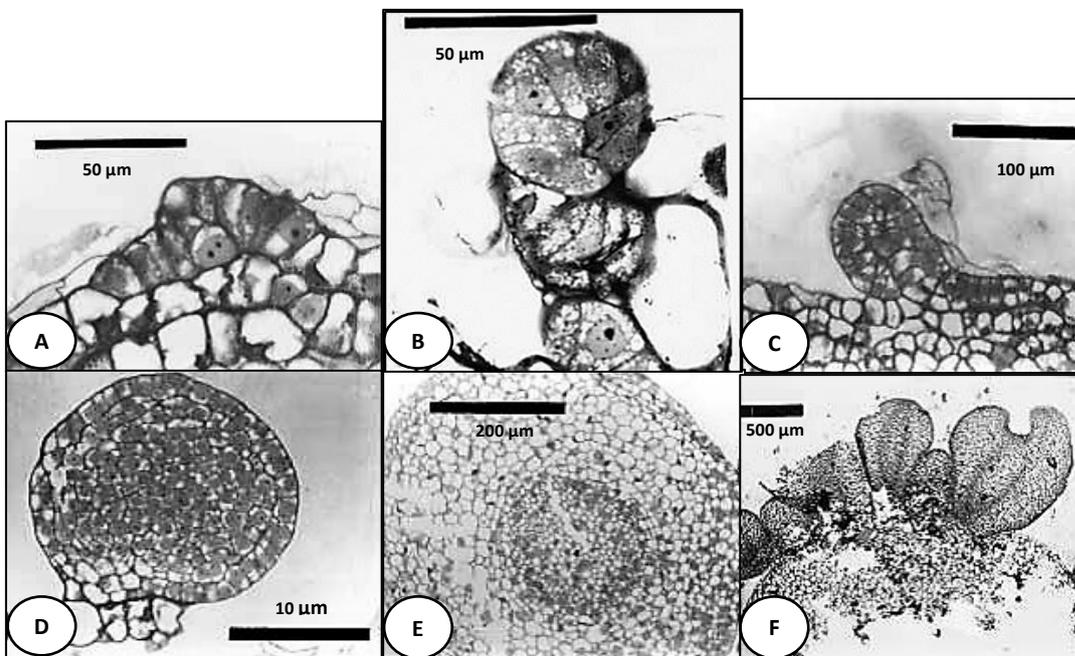


Figura 7 - Amostras de análise histológica: A) Atividade mitótica intensa, localizada nas células epidérmicas; B) estágios iniciais da atividade mitótica adventícia da epiderme e células subepidérmicas; C) Embrião a assumir uma forma globular. A atividade mitótica está presente numa estrutura que se assemelha a um suspensor; D) Embrião globular: presença de uma camada epidérmica e células estão todas no mesmo grau de diferenciação; E) Secção transversal de um embrião em estágio transitório, de globular para torpeda; F) Embrião somático de radícula: os tecidos do *calli* degeneram, enquanto na superfície acontece o desenvolvimento de vários embriões somáticos em diferentes fases, de globular até à fase coração. Adaptado de Benelli *et al.* (2015).

Verifica-se ainda que a evolução dos embriões não é sincronizada, por isso, num momento determinado, é possível observar-se embriões em vários estádios de desenvolvimento (Figura 7 - F).

Ainda segundo estes autores, nem sempre as massas que acabamos de descrever são embriogénicas, na maioria dos casos, são apenas tecidos dos *calli*, com distribuição desigual das atividades mitóticas e tentativa de organogénese adventícia. As massas globulares embriogénicas são, como já referido, delimitadas por paredes celulares espessas, e, de acordo com Capelo *et al.* (2010), a espessura das paredes é considerada uma característica das células embriogénicas, uma vez que garante um isolamento suficiente para a expressão da totipotência

Ainda com base em observações histológicas, Toufik *et al.* (2014), verificaram que embriões somáticos em forma de coração não se isolavam completamente dos tecidos do explante inicial, mas possuíam polos caulinares e radiculares, estes últimos tornando-os facilmente separáveis do mesmo. Os mesmos autores confirmaram ainda que a epiderme destes embriões é altamente embriogénica e pode conduzir a processos de embriogénese secundária.

2.7. A Embriogénese Somática em Oliveira

A embriogénese somática em oliveira foi relatada pela primeira vez por Rugini e Tarini (1986). Estes autores conseguiram com sucesso a formação de *calli* e posteriormente de embriões somáticos, após a indução de ferimentos em raízes de plântulas cultivadas *in vitro*. Também Orinos e Mitrakos (1991) em *Olea europaea* L. ssp. *europaea* var. *sylvestris*, assim como Mitrakos *et al.* (1992) e Cerezo *et al.* (2011) em *Olea europaea* L. ssp. *europaea* var. *sativa*, conseguiram bons resultados com a utilização de radículas isoladas de embriões maduros para induzir o processo de embriogénese somática. Nestes casos, foi requerido um meio de cultura com uma razão auxina/citocinina elevada para induzir a formação de *calli* embriogénicos e seguidamente um meio de cultura sem reguladores de crescimento ou com uma concentração de auxina muito baixa, para promover a diferenciação de embriões somáticos (Tabela 1). Requisitos semelhantes foram referidos por vários autores aquando da utilização de cotilédones (Leva *et al.*, 1995; Brhadda *et al.*, 2003) ou segmentos de raízes (Rugini, 1995; Rugini *et al.*, 1995; Shibli *et al.*, 2011) extraídos de sementes germinadas *in vitro* (Tabela 1).

Em material adulto, a embriogénese somática foi conseguida por Rugini e Caricato (1995), nas cvs. 'Canino' e 'Moraiolo', com a utilização de pecíolos originados a partir de rebentos adventícios. Estes autores utilizaram o meio de cultura OME (*Embryogenesis olive medium*) suplementado com 0.5 μ M de 2iP (2-isopenteniladenina), 0.44 μ M de BA, 0.25 μ M de AIB (ácido índol-3-butírico) e 0.42 mM de cefotaxima. As estruturas embriogénicas originadas proliferam quando mantidas no escuro, no mesmo meio de cultura, ou num meio livre de reguladores de crescimento, suplementado com 0.1% de carvão ativado. Neste último caso, a proliferação de embriões somáticos aconteceu diretamente de células epidérmicas ou subepidérmicas de embriões primários (Benelli *et al.*, 2001). Também com os meios MS (Brhadda *et al.*, 2003; Capelo *et al.*, 2010) e MS/2 (Mazri *et al.*, 2013), se obtiveram resultados favoráveis em fragmentos de folhas adultas e pecíolos (Tabela 1).

Mazri *et al.* (2013), na cv. marroquina 'Dahbia', conseguiram induzir o processo de embriogénese somática após a passagem dos explantes (secções de folhas de rebentos instalados *in vitro*) durante 4 dias por meio MS/2 suplementado com 30 μ M de TDZ (tidiazurão) e 0.5 μ M de NAA (Ácido 1-naftaleneacético). De seguida essas folhas foram transferidas para meio MS sem a adição de reguladores de crescimento durante 8 semanas (Tabela 1). Na fase de expressão os autores transferiram os *calli* para meio ECO (*Olive cyclic embryogenesis*) suplementado com 0.5 μ M de 2iP, 0.44 μ M de BA, 0.25 μ M de AIB como proposto por Rugini e Caricato (1995).

A composição mineral requerida para a embriogénese somática na oliveira parece depender do explante e do genótipo. Orinos e Mitrakos (1991) e Mitrakos *et al.* (1992) utilizando o meio de cultura OMc (*Olive medium* adaptado por Cañas e Benbadis 1988), com os macronutrientes propostos por Bourgun e Nitsch (1967), obtiveram bons resultados na formação de embriões somáticos em radículas e cotilédones de embriões maduros. Porém, nos casos em que a indução foi conseguida a partir de raízes provenientes plântulas germinadas *in vitro*, os melhores resultados foram conseguidos com o meio MS (Rugini, 1995; Rugini *et al.*, 1995; Shibli *et al.*, 2001) (Tabela 1).

Tabela 1 - Embriogênese somática em oliveira. Adaptado de Rallo *et al.* (2018).

Cultivar	Explante	Indução/Proliferação de <i>calli</i>	Desenvolvimento de Embriões	Conversão	Referências
Frantoio/ Moraiole/ Dolce Agogia	Embriões maduros	1/2 MS + (0.5-2.5 µM) BA ± 0.5 µM NAA	1/2 meio MS basal	OM + (0.5 - 2.5) µm zeatina	Rugini (1988, 1995); Rugini et al. (2005)
Zambujeiro	Radículas e cotilédones de embriões maduros	OMc + 2.5 µM 2iP + 25 µM AIB	OMc + 0.5 µM AIB	1/2 meio basal MS	Orinos e Mitrakos (1991)
Koroneiki	Radícula de embriões maduros	OMc + 2.5 µM 2iP + 25 µM AIB	OMc ± 2.5 µM AIB	-	Mitrakos et al. (1992)
San Agostino	Raízes de sementes	MS + 25 µM NAA + 0.5 µM BA	1/2 MS + 0.5 µM NAA + 0.5 µM BA	1/4 MS + 2.5 µM zeatina	Rugini (1995); Rugini et al. (1995)
Frangivento/ Picholine/ Frantoio	Cotilédones imaturos	SH + 2.5 µM NAA ± 0.5 µM 2iP	Meio basal SH	Meio basal SH	Leva et al. (1995)
Canino/ Moraiole	Folhas/ pecíolos de rebentos adultos de origem adventícia	OMc + 0.2 µM 2iP + 0.44 µM BA + 0.25 µM AIB	Meio OMc basal líquido ou OMc sólido + 0.1% AC	OMc + 1.3 µM zeatina	Benelli et al. (2001); Rugini e Caricato (1995); Rugini et al. (2005)
Nabali	Raízes de sementes	MS + 5.0 µm 2,4D+ 0.5 µM Kinetina + 5.0 µM NAA	MS + 10 µm 2iP	Meio basal MS	Shibli et al. (2001)
Picholine Marroquina	Cotilédones	MS + 2.3 µM zeatina + 10.7 µM NAA	MS + 2.3 µm zeatina	MS + 2.3 µm zeatina	Brhadda et al. (2003)
Chetoui/ Chemlali/ Arbequina	Cotilédones	OMc + 25 µM AIB + 2.5 µM 2iP	Meio basal OMc	OM + 4.6 µM zeatina	Trabelsi et al. (2003)
Chondrolia Chalkidikis	Cotilédones imaturos e maduros	1/2 MS + 4.44 µM BA + 2.26 µM 2,4D 1/2 MS + 4.44 µM BA	1/2 MS + 4.44 µM BA + 2.26 µM 2,4 D 1/2 MS + 4.44 µM	-	Pritsa e Voyiatzis (2004)
Zambujeiro	Folhas/ pecíolos adultos	MS + 12.25 µM AIB + 4.56 µM zeatina	Meio MS basal	-	Capelo et al. (2010)
Picual	Radícula de embriões maduros	OMc + 2.5 µM 2iP + 25 µM AIB OMc + 0.5 µM AIB ECO + 0.2 µM 2iP + 0.44 µM BA + 0.25 µM AIB	ECO + 0.1% AC	1/3 Macronutrientes MS + 10 g/l sacarose	Cerezo et al. (2011)
Dahbia	Folhas adultas	1/2 MS + 30 µM TDZ + 0.5 µM NAA 1/2 MS basal ECO + 0.2 µM 2iP + 0.44 µM BA + 0.25 µM AIB	-	-	Mazri et al. (2013)

Num estudo comparativo entre as formulações basais dos meios OMc e ECO, Cerezo et al. (2011), observaram taxas de indução e proliferação semelhantes, contudo, as estruturas embriogénicas formadas em meio ECO, com menor concentração mineral, apresentaram uma maior capacidade para evoluírem e conduzirem à formação de embriões maduros (Tabela 1).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A cultivar ‘Galega vulgar’ foi utilizada em todos os ensaios realizados e foram testados três tipos de materiais iniciais;

- Embriões zigóticos e cotilédones de sementes maduras,
- Estruturas masculinas (estames) e femininas (carpelos), de flores em diferentes estádios de desenvolvimento,
- Pecíolos de folhas provenientes de explantes em cultura *in vitro*.

3.1. Ensaio com Radículas e Cotilédones de Embriões Zigóticos

Neste ensaio conjugam-se os protocolos propostos por Rugini e Silvestri (2016) e Cerezo *et al.* (2001). Ambos os autores conseguiram com sucesso a obtenção de embriogénese somática em material juvenil de oliveira. A principal diferença entre os protocolos referidos reside no facto de Cerezo *et al.* (2001), terem utilizado na fase de expressão, um meio de baixa concentração iónica, meio ECO.

3.1.1. Origem dos materiais e a sua preparação

Os frutos utilizados para extração das sementes, foram gentilmente cedidos pelo INIAV e recolhidos em Elvas, na Coleção Nacional de Referência de Cultivares de Oliveira, em árvores com 8 anos da cv. ‘Galega vulgar’. A recolha fez-se no estado de maturação total do fruto (Novembro de 2016). A polpa foi retirada manualmente, e, após devidamente lavadas, as sementes foram mantidas no frio (4-5°C), para quebra da dormência fisiológica do embrião, até à realização dos ensaios.

O endocarpo foi partido com recurso a uma prensa manual (Figura 8 – A e B) e as sementes foram isoladas (Figura 8 - C) e colocadas em água destilada estéril (autoclavada a 121°C, durante 20 minutos), durante 42h no escuro, a uma temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, antes de se iniciar o processo de desinfeção superficial.



Figura 8 – Prensa manual utilizada na remoção do endocarpo da semente (A); Endocarpo quebrado com semente no interior (B); Semente depois de removido o endocarpo (C).

3.1.2. Processo de desinfecção das sementes

O processo de desinfecção das sementes consistiu numa primeira passagem das sementes por uma solução de álcool etílico a 70% (v/v), durante 2 minutos (min.). Depois disso removeu-se o álcool e no mesmo recipiente procedeu-se a uma lavagem com água bidestilada estéril. Seguidamente passaram-se as sementes para uma solução de hipoclorito de cálcio a 10% de cloro ativo (p/v), à qual se adicionou 0,1% de *Tween-20*. Os frascos com o material vegetal estiveram então sob agitação numa placa eletromagnética durante 20 minutos. Por último, retirou-se a solução de hipoclorito de cálcio e realizaram-se 3 lavagens consecutivas com água bidestilada estéril.



Figura 9 – Interior da semente em corte transversal (A); Cotilédones (B) e Radícula (C). Barras: 500 μm .

Já em condições de assepsia, as radículas e cotilédones foram excisados cuidadosamente do interior (Figura 9).

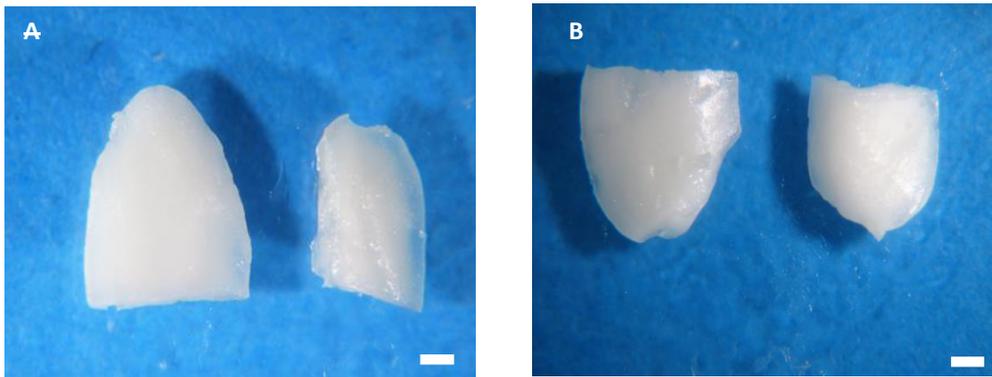


Figura 10 – Cotilédones distais (A) e cotilédones proximais (B) colocados em cultura. Barras: 500 μm .

As radículas foram colocadas inteiras em cultura, como se visualiza na figura 9 - C), enquanto os cotilédones foram separados e cortados em partes distais e proximais (Figura 10 – A e B).

3.1.3. Indução *in vitro*

Os explantes foram colocados em meio de cultura OMc (Cañas e Benbadis, 1988), cuja formulação se apresenta no Anexo 1, suplementado com 0.5 mg l^{-1} de 2-iP, 5 mg l^{-1} de AIB e 7 g l^{-1} de Ágar-Powder (VWR - Portugal). O meio de cultura foi distribuído em placas de Petri com 7 centímetros (cm) de diâmetro, às quais se adicionaram 25 ml do meio de cultura atrás referido. Os explantes permaneceram neste meio durante 21 dias, a 25°C , com um fotoperíodo de 16h e uma intensidade luminosa de $40 - 45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, ou alternativamente em obscuridade.

3.1.4. Expressão *in vitro*

Depois de terminada a fase de indução, os explantes foram transferidos para meio de cultura OMc sem a adição de reguladores de crescimento como proposto por Rugini e Silvestri (2016).

Após o desenvolvimento de embriões somáticos e de duas repicagens em meio de cultura OMc, os *calli* tornaram-se castanhos e necrosados. Realizou-se então a sua transferência para meio ECO (Cerezo *et al.*, 2011). A formulação do meio ECO é baseada

na formulação do meio OMe (Cañas e Benbadis, 1988) que contém $\frac{1}{4}$ de macronutrientes OM, $\frac{1}{4}$ micronutrientes MS, $\frac{1}{2}$ vitaminas OM (Anexo 1), 50 mg l⁻¹ mio-inositol, 20 g l⁻¹ sacarose, 550 mg l⁻¹ de L-glutamina e suplementado com 0.5µM de 2iP, 0.44 µM de BA, 0.23 µM de AIB e 0.42mM de cefotaxima, filtrada e adicionada ao meio depois de autoclavado, como recomendado por Rugini e Caricato (1995) e gelificado com 2,5 g l⁻¹ de *Sigma-Phytigel*.

3.1.5. Maturação e germinação de embriões

Para a maturação e germinação dos embriões somáticos teve-se por base o trabalho de Bradaï *et al.* (2016) em que embriões somáticos maiores que 3 mm foram removidos dos *calli* embriogénicos e transferidos para outro meio de cultura. Assim embriões somáticos com rebentos ou alongamento de raízes superiores ou igual a 3 mm foram transferidos de meio ECO para meio OMc sem reguladores de crescimento.

Para esta fase foram utilizados frascos de vidro de 180 ml com tampa de plástico. Estes foram previamente esterilizados em autoclave durante 20 minutos, a uma temperatura de 121°C e 1 bar de pressão. Depois deste processo o meio de cultura foi adicionado a cada frasco numa quantidade de 40 ml.

Os embriões germinados foram mantidos no meio OMc sem reguladores até os rebentos atingirem cerca de 10 cm de altura. Nesta altura as plantas foram retiradas dos frascos e aclimatizadas.

3.1.6. Aclimatização

Nesta fase as jovens plantas que se desenvolveram e evoluíram foram transferidas para tabuleiros alveolados de polipropileno com 28 alvéolos e volume aproximado de 200 ml de substrato por alvéolo. O substrato utilizado para a climatização foi composto por uma mistura de areia, perlite e turfa na proporção de 1:1:3 (v/v).

Os tabuleiros foram colocados em estufins com uma cobertura de plástico transparente de polietileno, de forma a manter uma humidade relativa elevada durante os primeiros 10 – 15 dias de aclimatização, evitando assim a desidratação das plantas.

Terminado este período, a cobertura plástica foi retirada dos estufins e os tabuleiros com as plantas permaneceram mais 15 dias numa câmara de crescimento com fotoperíodo e temperatura controlada, 24°C durante o dia e 22°C à noite. O fotoperíodo foi de 16h e a intensidade luminosa de $90 \mu\text{M m}^2 \text{s}^{-1}$.

Na última fase do processo de aclimatização as plantas foram transferidas para uma estufa e envasadas em vasos de 2 litros com o mesmo tipo de substrato já referido anteriormente.

3.1.7. Delineamento experimental e análise de dados

Na fase de indução as variáveis em estudo foram o tipo de explante utilizado, os meios e as condições de cultura. Testaram-se três tipos de explante (radículas, cotilédones distais e proximais) e duas condições ambientais, fotoperíodo de 16h e escuro. O ensaio seguiu um delineamento em fatorial completo, cada placa de Petri com 10 explantes funcionou como uma repetição, tendo o número de repetições sido variável por tratamento e nunca inferior a 20. Recolheram-se dados relativamente à taxa de formação de *calli* e ao desenvolvimento de raízes adventícias.

Na fase de expressão, as variáveis em estudo foram o tipo de explante utilizado e as condições de cultura. Deste modo, testaram-se os três tipos de explantes já referidos anteriormente e duas condições ambientais, fotoperíodo de 16h e escuro. O ensaio seguiu um delineamento em fatorial completo, tendo o número de repetições sido variável por tratamento e nunca inferior a 14. Recolheram-se dados relativamente à evolução dos *calli* e número de embriões formados.

Todos os dados recolhidos foram submetidos a análise de variância, seguida de uma análise de comparação de médias pelo teste de Fisher (LSD). As diferenças significativas foram registadas para valores de $p \leq 0,05$.

3.2. Ensaio com Estames e Carpelos

Tendo conhecimento de apenas um trabalho em que as estruturas florais foram usadas sem sucesso, como material inicial, para indução de embriogénese somática em oliveira, os ensaios cujos resultados aqui se apresentam foram essencialmente exploratórios. Assim, para além do meio de cultura utilizado no ensaio referido (Mazri *et al.*, 2013), utilizaram-se também meios de cultura vulgarmente referidos em oliveira para a indução de embriogénese somática em tecidos de natureza juvenil (Orinos e Mitrakos, 1991; Mitrakos *et al.*, 1992) e ainda os propostos por Cardoso *et al.*, (2010), que com sucesso conseguiu induzir a formação de embriões somáticos em estames e carpelos de videira.

3.2.1. Origem dos materiais e sua preparação

Gomos florais da cv. 'Galega vulgar' foram recolhidos durante os meses de Abril e Maio de 2017, na Herdade da Mitra na Universidade de Évora e mantidos no frio (4-5°C), até à inoculação *in vitro*.

Sendo conhecida em outras espécies a influência do estágio de evolução dos gametófitos na resposta embriogénica (Peixe (2002), em damasqueiro e Cardoso (2006), em videira) antes de se proceder à recolha do material vegetal, que serviu de base para os ensaios, foi necessário procurar uma correlação entre a fenologia do botão floral e o estágio de evolução da microsporogénese.

Com este objetivo, os gomos foram esmagados por pressão entre a lâmina e a lamela, corados com algumas gotas do corante carmim, numa solução a 45% de ácido acético e finalmente observados em microscópio ótico de campo claro. Foi assim possível definir qual o estágio fenológico correspondente ao estágio de tétrada dos micrósporos (Figura 11) e deste modo selecionar para inoculação em cultura botões com



Figura 11 - Micrósporos na fase de

micrósporos em fase de tetrada, pré-tetrada e pós-tetrada, assim como os correspondentes carpelos (Figura 12).



Figura 12 – Estádios de desenvolvimento de gomos florais, estames e carpelos: A),D), G) Estádio pré-tetrada; B), F) e H) Tetrada; C), F) e I) pós-tetrada. Barra: 500 μ m.

3.2.2. Processo de desinfecção e seleção dos gomos florais

O processo de desinfecção dos gomos florais foi idêntico ao realizado com o material juvenil descrito no capítulo anterior (ver 3.1.2.).

Depois da desinfecção e já em ambiente assético, os estames e os carpelos foram excisados do interior dos botões florais. Estes explantes foram então inoculados em cultura de acordo com o seu estágio.

3.2.3. Indução *In vitro*

Nesta fase foram testados três meios de cultura (Anexo 1):

- MS/2 suplementado com 30 μM de TDZ e 0.5 μM de NAA (Mazri *et al.*, 2013);
- OMc (Cañas e Benbadis, 1988) suplementado com 25 μM de AIB e 2.5 μM de 2iP (Orinos e Mitrakos, 1991; Mitrakos *et al.*, 1992);

- Nitsch e Nitsch (1969), suplementado com 5 μM de 2,4-D, 1 μM de BAP, 100 mg l^{-1} de L-gutamina, 10 mg l^{-1} de L-fenilalanina e 1mg l^{-1} de adenina (Cardoso *et al.*, 2010).

Os explantes foram inoculados em placas de Petri com 5 cm de diâmetro, às quais se adicionou 15 ml de meio de cultura. Durante 4 dias os explantes foram expostos a temperaturas diferenciadas de 5°C, 25°C, 30°C e seguidamente passados para uma temperatura contante de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante três semanas.

Os meios de cultura MS/2 e OMc foram gelificados com 7 g l^{-1} de *Ágar-Powder* (VWR – Portugal) e o meio NN com 2,5 g l^{-1} de *Sigma-Phytigel*.

3.2.4. Expressão *in vitro*

Ao fim das três semanas, os *calli* foram transferidos para meio de expressão de forma a promover a formação de embriões somáticos. Nesta fase foram utilizadas as mesmas formulações base dos meios MS/2 e NN (Anexo 1), sem adição de reguladores de crescimento, sendo o meio OMc (Anexo 1) suplementado com 0.5 μM de 2iP, 0.44 μM de benziladenina (BA), 0.25 μM de AIB e 0.42 μM cefotaxima (Cerezo *et al.*, 2011), sendo esta filtrada e adicionada ao meio depois de autoclavado.

As condições de crescimento para os meios MS/2 e OMc foram no escuro, enquanto os explantes em meio NN foram expostos a um fotoperíodo de 16h e uma intensidade luminosa de 34 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Todos os meios permaneceram a uma temperatura constante de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ sendo os *calli* mantidos nestas condições durante 8 semanas tendo sido repicados para meio fresco ao final de cada 4 semanas.

3.2.5. Delineamento experimental e análise de dados

Na fase de indução as variáveis em estudo foram o tipo de explante utilizado, os meios de cultura e as temperaturas de indução. Testaram-se 2 tipos de explantes em três estádios distintos (pré-tétrada, tétrada e pós-tétrada), em três meios de cultura e três temperaturas de indução. O ensaio seguiu um delineamento em fatorial completo, com um número variável de repetições. Cada placa de Petri com 8 estames e 4 carpelos funcionou como uma repetição e o número de placas utilizadas em cada tratamento nunca foi inferior a 20. Recolheram-se dados relativamente à taxa de formação de *calli* em função dos meios e condições de cultura e relativamente à cor e estrutura dos *calli* obtidos.

Todos os dados recolhidos foram submetidos a análise de variância, seguida de uma análise de comparação de médias pelo teste de Fisher (LSD). As diferenças significativas foram registadas para valores de $p \leq 0,05$.

Depois disto, os *calli* obtidos foram utilizados em ensaios essencialmente exploratórios, não permitindo um tratamento estatístico adequado dos dados recolhidos.

3.3. Ensaio em Pecíolos

Este ensaio seguiu o protocolo proposto por Rugini e Caricato (1995), em trabalho realizado com as cultivares 'Canino' e 'Moraiolo'. Estes autores, utilizando os meios M/ e OMs, conseguiram induzir a formação de rebentos adventícios sobre *calli* e posteriormente a formação de embriões somáticos sobre pecíolos retirados das folhas neoformadas.

3.3.1. Origem dos materiais e sua preparação para indução *in vitro*

Foram utilizados como material inicial pecíolos da cv. 'Galega vulgar', clone 1441, excisados de folhas de plantas mantidas em cultura *in vitro*, no Laboratório de Melhoramento e Biotecnologia Vegetal na Universidade de Évora (Figura 13).

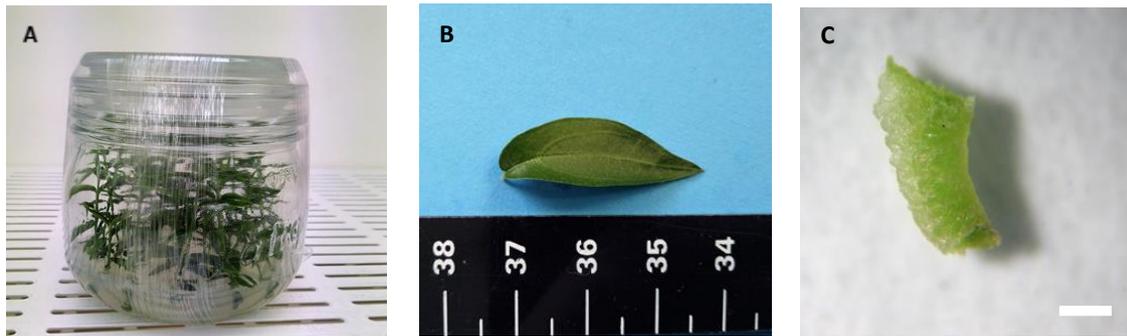


Figura 13 – Plantas em cultura *in vitro* da cv. ‘Galega vulgar’ clone 1441 (A); Folha excisada de planta (B); Pecíolo separado de planta e folha (C). Barra: 500 μm .

3.3.2. Indução *in vitro*

As folhas foram assepticamente separadas das plantas e os pecíolos isolados e cultivados nos seguintes meios de cultura, cujas formulações base se apresentam no Anexo 1;

- MS/2 suplementado com 30 μM de TDZ, 0.54 μM de NAA e 4% de sacarose;
- OMs (meio OM com macronutrientes Bourgin e Nitsch, 1967), suplementado com 10 μM de 2iP e 2.2 μM de BAP, 1 g l⁻¹ de caseína hidrolisada e 3% sacarose.

Os meios foram distribuídos em placas de Petri, com 8 cm de diâmetro, às quais se adicionou 30 ml de meio. Foram ambos gelificados com 7 g l⁻¹ de *Ágar-Powder* (VWR - Portugal).

Com o intuito de induzir a formação de embriões somáticos, depois dos pecíolos formarem *calli* e de se conseguir organogénese com a neoformação de pequenas folhas, estas foram transferidas para meio de cultura OMe (Cañas e Benbadis, 1988) suplementado com 0.5 μM de 2iP, 0.44 μM de BAP, 0.25 μM de AIB, 1 g l⁻¹ de caseína hidrolisada, 3% sacarose e 0.42mM de cefotaxima (Anexo 1).

Todas as culturas foram colocadas numa câmara de crescimento com um fotoperíodo de 16 horas com uma intensidade luminosa de 40 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ e com temperatura contante de 28 \pm 1°C.

3.3.3. Expressão *in vitro*

Passadas 4 semanas, depois de se obter a formação de *calli* sobre as folhas neoformadas, estes foram transferidos para placas de Petri com papel de filtro (*Whatman* No. 6) às quais se adicionou 15 ml de meio de cultura líquido OMe (Anexo 1) com a mesma composição referida no capítulo anterior (ver 3.3.2). O meio de cultura antigo foi removido com auxílio de uma pipeta a cada três semanas e adicionado meio de cultura fresco.

As condições de cultura foram as mesmas apresentadas no capítulo anterior (ver 3.3.2.).

3.3.4. Delineamento experimental e análise de dados

Na fase de indução, a variável em estudo foi o meio de cultura. Para cada meio, uma placa de Petri com 20 pecíolos funcionou como repetição, sendo o número de repetições variável e nunca inferior a 15.

Os dados recolhidos foram submetidos a análise de variância, seguida de uma análise de comparação de médias pelo teste de Fisher (LSD). As diferenças significativas foram registadas para valores de $p \leq 0,05$.

Não se procedeu à análise de dados na fase de expressão uma vez que a formação de *calli* a partir das pequenas folhas neoformadas não permitiu o tratamento estatístico devido à pequena taxa de sucesso conseguida.

3.4. Condições Gerais de Trabalho

3.4.1. Preparação dos meios de cultura

Antes da preparação dos meios de cultura foi necessário fazer as soluções mãe de macronutrientes, micronutrientes, ferro, vitaminas e reguladores de crescimento.

O pH de todos os meios foi corrigido com hidróxido de potássio (KOH) e ajustado a 5.8 previamente à adição do ágar, sendo de seguida esterilizados em autoclave (figura 14 - A), a uma temperatura de 121°C e 1 bar de pressão. A esterilização fez-se para a

quantidade de meio necessária a cada tratamento de cada ensaio e só depois disso o mesmo foi dispensado nos recipientes de cultura previamente esterilizados, sendo este trabalho feito em condições de assépsia em câmara de fluxo laminar.

3.4.2. Esterilização de materiais

Em todos os ensaios os explantes foram manuseados em condições de assepsia numa câmara de fluxo laminar horizontal e com recurso a placas de Petri de vidro esterilizadas através de calor seco, numa estufa a 180°C durante 3 horas.

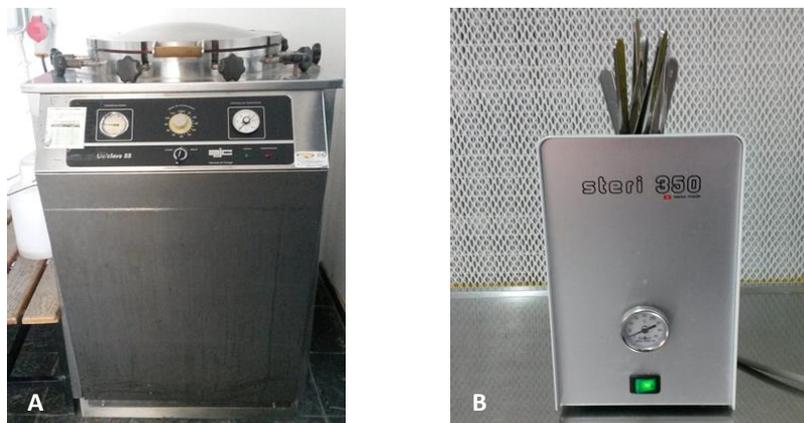


Figura 14 - Esterilizador de esferas de vidro (A); Autoclave para esterilização de meios de cultura (B).

Os instrumentos de corte utilizados para a transferência e manipulação do material vegetal, pinças e bisturis, foram esterilizados através da sua imersão em álcool etílico a 70% (v/v) e por passagem pelo esterilizador de esferas de vidro a 250°C (figura 14 - B).

3.4.3. Preparação de amostras para análise histológica

3.4.3.1. Fixação e Impregnação em Parafina

Para a observação e identificação das estruturas celulares foram fixados *calli* e embriões numa solução de F.A.A (formol: 1; ácido acético:1; etanol 70%:8 + umas gotas

de Tween-20). A desidratação das amostras realizou-se através de uma série de soluções com concentração crescente de butanol (10, 20, 35, 55, 75, 95ml) como se indica na tabela 2, seguida de 2 banhos de xilol (30 minutos cada).

Tabela 2- Série de soluções com concentração crescente de Butanol.

Solução	H ₂ O (ml)	Etanol (ml)	Butanol (ml)	Eosina (ml)	Tempo (h)
I	50	40	10	-	4
II	30	50	20	-	12...
III	15	50	35	-	2
IV	-	45	55	0.025	2
V	-	25	75	0.025	2
VI	-	5	95	-	12

De seguida as amostras foram impregnadas com parafina liquefeita através de 3 banhos (Tabela 3) e mantidas a 60°C numa estufa *VENTI-Line VL115*, durante 3 dias.

Tabela 3 - Duração dos banhos com parafina liquefeita.

Banhos	Tempo (h)
I	4
II	4
III	48...

Depois dos blocos em parafina serem confeccionados procedeu-se à sua preparação para efetuar os cortes no micrótomo. Para tal foi talhada a região do bloco que continha a amostra, numa forma tronco-piramidal por facilitar o seccionamento obtendo-se superfícies de corte adequadas.

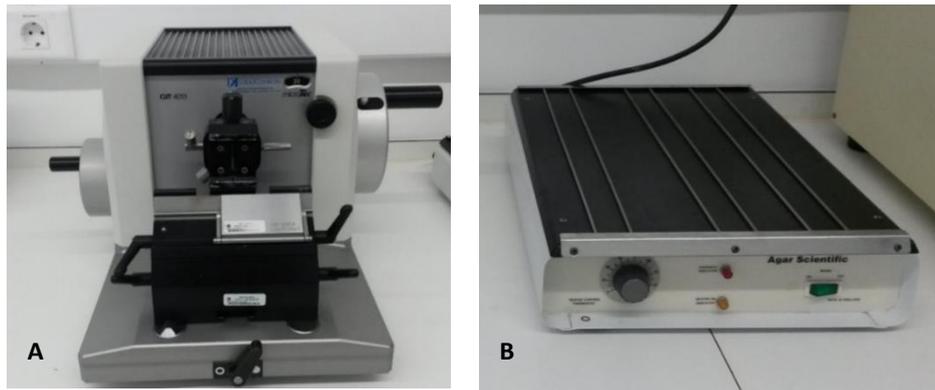


Figura 15 - Micrótopo rotativo *MicroTec Cut4055* (A) e placa elétrica de aquecimento *Agar Scientific* (B).

O seccionamento dos blocos foi efetuado num micrótopo rotativo *MicroTec Cut4055* (Figura 15 - A), com um ângulo de faca de 30°. Foram utilizadas facas de aço descartáveis e a espessura dos cortes variou entre os 5 e os 7 μm .

De seguida foi necessário proceder à montagem das ténias em lâminas de vidro, onde cada ténia foi dividida em pequenas porções, com o comprimento de cerca de $\frac{3}{4}$ do comprimento da lâmina. Em cada lâmina foram colocadas duas ou três porções de ténia, conforme permitia o tamanho das amostras e a quantidade de parafina envolvente.

As lâminas foram colocadas numa placa elétrica de aquecimento *Agar Scientific* (Figura 15 - B), à temperatura aproximada de 35-40°C até as secções ficarem perfeitamente aderentes à lâmina.

3.4.3.2. Desparafinação e Coloração

Antes de se proceder à coloração das secções, foi necessário proceder à remoção da parafina. Neste sentido, na desparafinação foram utilizados cestos de histologia e tinas de imersão, que permitem obter resultados mais homogéneos e evitar o eventual dano das amostras.

A desparafinação das lâminas foi efetuada numa *hotte* e consistiu numa imersão das mesmas em 2 banhos de xilol de 5 minutos cada. Depois deste passo seguiu-se a hidratação do material através de banhos numa série decrescente de etanol (100, 95, 70, 50, 30%) e água destilada, sendo de seguida efetuada a coloração e desidratação.

Para a coloração foi seguido o método proposto por Sass (1958) onde foram utilizados os corantes ‘Safranina O’, preparada numa solução aquosa a 1%, e ‘Fast Green’, preparado a 0,5% em etanol a 95%. A utilização destes dois corantes deveu-se ao facto da ‘Safranina O’ em tecidos vegetais fornecer um vermelho brilhante aos cromossomas, núcleos e paredes celulares lenhificadas ou cutinizadas e o corante ‘Fast Green’ um verde brilhante ao citoplasma e às paredes celulares celulósicas.

Após a coloração com ‘Safranina O’ o material foi desidratado através de banhos numa série de soluções crescentes de etanol (30, 50, 70, 95%) e corado com ‘Fast Green’ durante 5 segundos; termina-se com três passagens rápidas por etanol absoluto e deixa-se secar totalmente.

Tabela 4 - Sequencia das fases do processo de coloração e respetivos tempos de contacto.

Fases do Processo de Coloração	Tempo
1. Hidratação das amostras:	
▪ Banho de etanol 100%	5 min.
▪ Banho de etanol 95%	5 min.
▪ Banho de etanol 70%	5 min.
▪ Banho de etanol 50%	5 min.
▪ Banho de etanol 30%	5 min.
▪ Banho de água destilada	5 min.
2. Coloração em ‘Safranina O’	75 min.
3. Lavagem em água destilada	Até sair o excesso de ‘Safranina O’
4. Desidratação do material:	
▪ Banho de etanol a 30%	1 min.
▪ Banho de etanol a 50%	1 min.
▪ Banho de etanol a 70%	1 min.
▪ Banho de etanol a 95%	1 min.
5. Coloração com ‘Fast Green’	5 seg.
6. Três passagens por etanol absoluto	Passagens rápidas

Para a preparação definitiva das amostras as lâminas e lamelas foram passadas brevemente por xilol, aplicando-se de seguida sobre as lamelas algumas gotas de *Entellan* e a mesma foi cuidadosamente colocada sobre a lâmina com a amostra. As

preparações ficaram a secar à temperatura ambiente de um dia para o outro e mais tarde foram observadas num microscópio ótico.

Na tabela 4 sintetizam-se as principais operações de cada uma das fases do processo de coloração, assim como os tempos de permanência das secções nas várias soluções.

3.4.4. Registo e observação de resultados

Em todos os ensaios realizados, para o auxiliar na excisão dos explantes, assim como na observação e registo de dados, fez-se recurso a uma lupa *Olympus SZ60*. Para a observação dos cortes histológicos utilizou-se um microscópio ótico *Olympus CH3-TR45* e todas as imagens apresentadas foram registadas com uma câmara fotográfica digital *Canon A630*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para uma maior facilidade de interpretação e por concordância com a forma como foi estruturado o capítulo de Materiais e Métodos, os resultados que de seguida se apresentam estão divididos em três ensaios, que correspondem aos diferentes tipos de materiais iniciais utilizados para obtenção de resposta embriogénica; - Material de origem juvenil (embriões zigóticos); - Material adulto, nomeadamente, estames e carpelos excisados de gomos florais e pecíolos provenientes de plantas previamente instaladas *in vitro*.

4.1. Ensaio com Embriões Zigóticos

4.1.1. Fase de indução

As variáveis em análise nesta fase foram; - o tipo de explante, radículas e cotilédones (parte distal e parte proximal); - as condições de cultura (ausência de luz e fotoperíodo de 16h com uma intensidade luminosa de $40 - 45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Recolheram-se dados sobre a formação de *calli* nos explantes em cultura, que se resumem na tabela de análise de variância (Tabela 5). Como pode ver-se, das duas variáveis em estudo, apenas o tipo de material utilizado influenciou significativamente a taxa de calogénese.

Tabela 5 – Resumo da análise de variância para a taxa de calogénese na fase de indução. As diferenças significativas foram registadas para valores de $p \leq 0,05$.

Variáveis	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	p
Tipo de Explante	619	2	310	6.23	0.002
Luz	15	1	15	0.30	0.583
Explante*Luz	49	2	25	0.49	0.619
ERRO	8689	175	50		

Como pode ver-se na figura 16, onde se apresentam os intervalos de confiança obtidos após a análise de comparação de médias, verifica-se que a percentagem média de calogénese foi elevada para qualquer um dos explantes utilizados, com um mínimo de 95,3% nos cotilédones distais. Este valor foi, no entanto, significativamente menor que os obtidos para as radículas e os cotilédones proximais, ambos com cerca de 99% de calogénese e sem diferenças significativas entre si.

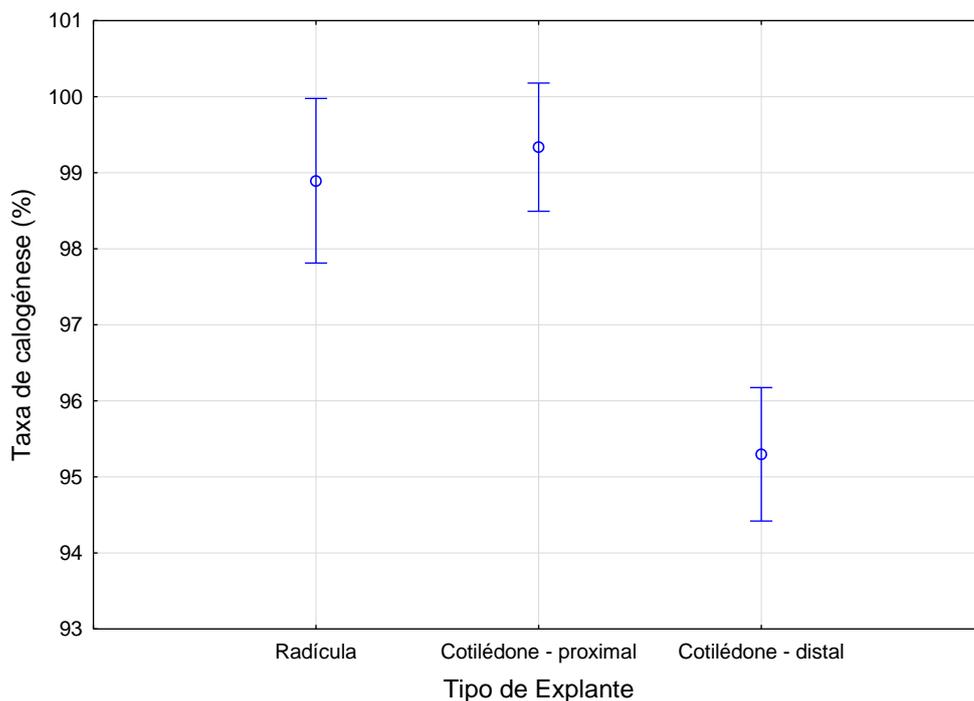


Figura 16 -Taxas de calogénese em função do tipo de explante inicial (LSD 95%).

Rugini e Silvestri (2016), autores cujo protocolo está a servir de referência a este ensaio, não especificam qual o material que apresentou melhores resultados na fase de indução relativamente à taxa de formação de *calli*. Outros autores, como Rugini e Pesce (2006), referem que os resultados dependem da origem do explante e da permanência deste no meio de indução.

4.1.2. Formação de estruturas adventícias

No final da fase de indução verificou-se a neoformação de estruturas, neste caso raízes, em todos os tipos de explantes testados, como se ilustra na figura 17.

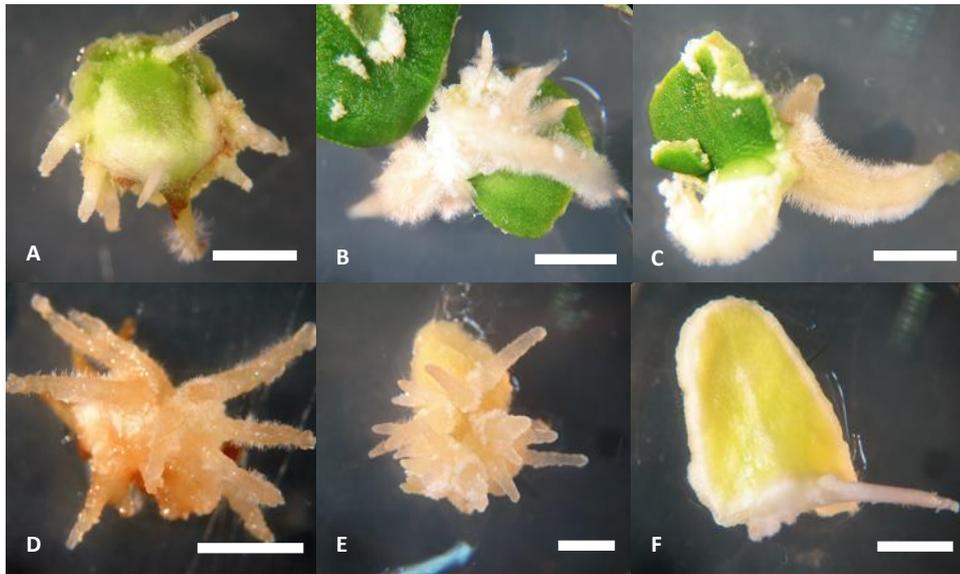


Figura 17 - Explantes expostos à luz (A, B e C) e ao escuro (D, E e F) ao fim de 21 dias em meio de indução OMc suplementado com 0.5 mg l^{-1} de 2-iP, 5 mg l^{-1} de AIB. A) e D) Radícula; B) e E) Cotilédone proximal; C) e F) Cotilédone distal. Barras: 5 mm.

Os resultados da análise de variância, que se apresentam na tabela 6, mostram que a variável que mais influenciou a formação destas estruturas adventícias foi a luz.

Tabela 6 - Resumo da análise de variância para a formação de estruturas adventícias. As diferenças significativas foram registadas para valores de $p \leq 0,05$.

Variáveis	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	p
Tipo de Explante	1.34967	2	0.67483	3.4662	0.033396
Luz	7.14939	1	7.14939	36.7220	0.000000
Explante*Luz	1.86169	2	0.93085	4.7812	0.009513
ERRO	34.07067	175	0.19469		

Como pode ver-se na figura 18, a neoformação de raízes foi superior na presença de luz em todos os explantes, apenas não se registando diferenças significativas entre a condição luz ou escuro, quando se usou como explante a parte distal dos cotilédones. Na realidade, neste tipo de explante a formação de raízes adventícias foi

significativamente menor que em qualquer um dos outros, independentemente das condições de cultura.

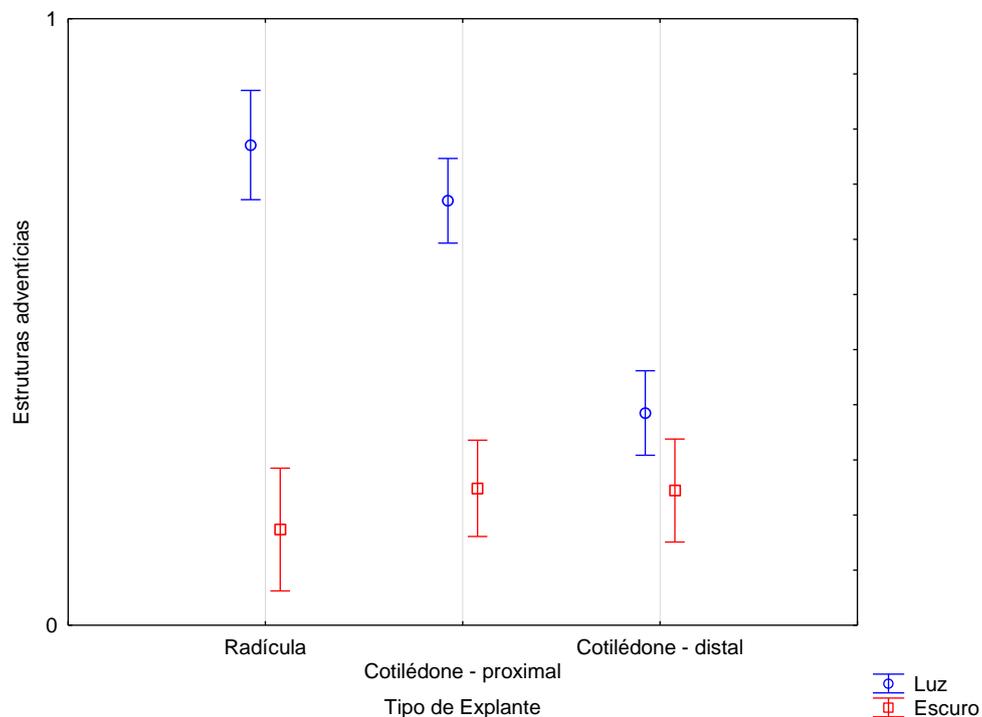


Figura 18 – Neoformação de raízes durante a fase de indução em função do tipo de explante e da presença ou ausência de luz (LSD 95%).

Orinos e Mitrakos (1991), trabalhando com *Olea europaea* var. *sylvestris* e em ensaios realizados com o intuito de obter embriogênese somática, também reportaram a neoformação de raízes em *calli* obtidos a partir de radículas e cotilédones de embriões zigóticos maduros. No entanto, no trabalho por eles realizado, apenas se registou este evento quando da utilização de cotilédones como explante inicial. Já Cerezo *et al.* (2011), em ensaios realizados com a cv. ‘Picual’ obtiveram ao fim de 3 semanas em cultura, a neoformação de raízes sobre *calli* obtidos a partir de radículas de embriões zigóticos. Este foi também o tempo em que estas estruturas adventícias surgiram no nosso ensaio.

4.1.2. Fase de expressão

Os resultados apresentados para esta fase correspondem a dois momentos. Em primeiro lugar serão analisados os resultados referentes ao meio de cultura OMc sem

reguladores de crescimento, proposto por Rugini e Silvestri (2006), e, em segundo lugar, serão examinados os resultados referentes ao meio ECO, proposto por Cerezo *et al.* (2011).

As variáveis em análise foram: o tipo de explante, radículas e cotilédones (distais e proximais), as condições de cultura (ausência de luz e fotoperíodo de 16h com uma intensidade luminosa de $40 - 45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Recolheram-se dados relativos à percentagem de *calli* formado em meio OMc sem reguladores de crescimento e ao número de embriões desenvolvidos.

Os resultados da análise de variância (Tabela 7) mostram que houve uma reposta diferenciada relativamente à taxa de calogénese, influenciada pela interação tipo material e condições de cultura.

Tabela 7 - Resumo da análise de variância para a taxa de calogénese na fase de expressão. As diferenças significativas foram registadas para valores de $p \leq 0,05$.

Variáveis	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	p
Tipo de Explante	3841.1	2	1920.5	2.1583	0.120023
Luz	2902.8	1	2902.8	3.2622	0.073423
Explante*Luz	13145.5	2	6572.7	7.3864	0.000947
ERRO	105981,3	119	889,8		

Pela análise da figura 19 compreende-se que esta resposta diferenciada dos explantes é influenciada essencialmente pelas condições de cultura. Assim, enquanto as radículas apresentam uma maior taxa de formação de *calli* quando colocadas à luz, os cotilédones apresentam uma maior taxa de calogénese no escuro.

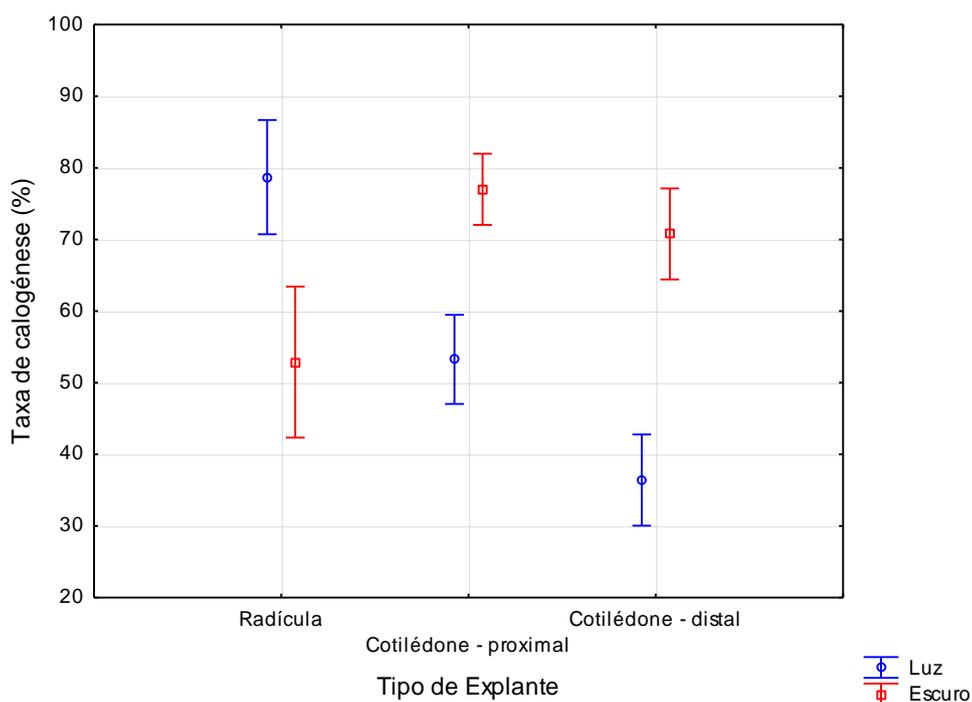


Figura 19 – Taxas de calogénese observadas na fase de expressão, em meio OMc sem reguladores de crescimento, em função tipo de explante e das condições de cultura (LSD 95%).

Nesta fase foram também recolhidos dados sobre a formação de embriões somáticos nos diferentes explantes em cultura, que se resumem na tabela 8. Como se verifica, a formação de embriões não parece ser influenciada por nenhuma das variáveis em estudo. Ainda assim, os intervalos de confiança gerados pela análise de comparação de médias, para a interação tipo de explante e condições de cultura apresentam-se na figura 20.

Tabela 8 - Valores de análise de variância para os explantes e condições de cultura apresentando os valores com diferença para valores de $p \leq 0,05$.

Variáveis	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	p
Tipo Explante	24.3032	2	12.1516	3.06040	0.050575
Luz	6.2169	1	6.2169	1.56574	0.213281
Explante*Luz	4.2843	2	2.1421	0.53950	0.584457
ERRO	472.5001	119	3.9706		

Da análise da mesma se conclui que, ainda que não existam diferenças significativas na análise conjunta das variáveis em estudo, a verdade é que a sua análise individual, mostra diferenças significativas entre a quantidade de embriões obtidos em função do explante utilizado. Nas radículas, quando a cultura se fez na presença de luz, obteve-se um número de embriões significativamente maior que o obtido para os cotilédones.

Diferenças significativas são também observadas entre o comportamento dos cotilédones distais, em função das condições de cultura, com um maior número de embriões formado no escuro.

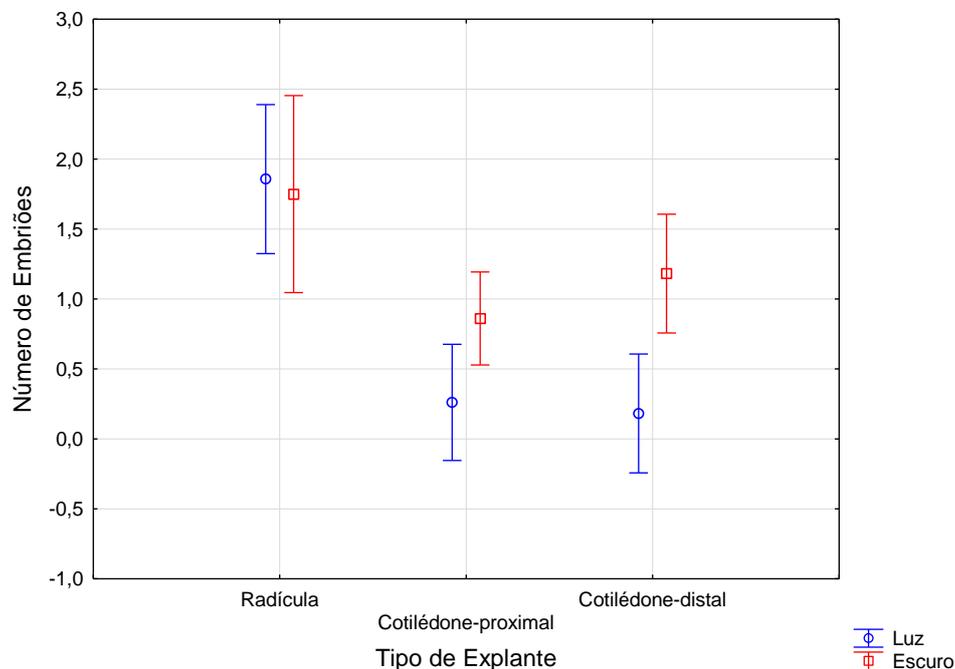


Figura 20 - Número de embriões formados em função do tipo de explante e das condições de cultura (LSD 95%).

Estes resultados coincidem com os de Orinos e Mitrakos (1991) e de Rugini e Silvestri (2016), que também conseguiram uma maior taxa de embriogênese somática com a utilização das radículas como explante inicial.

Relativamente às condições de cultura, Rugini (1988) e Rugini e Caricato (1995), referem que a presença de luz pode inibir a embriogênese somática e reportam os melhores resultados enquanto as culturas se desenvolveram na ausência desta.

Também Shibli *et al.* (2001) só conseguiram a obtenção de embriões somáticos com baixa intensidade luminosa.

Na observação histológica de *callus* embriogénico em corte transversal, proveniente de radícula, que se apresenta na figura 21 - A, pode ver-se a organização geral do *callus*, que se encontra delimitado por células com parede espessa, o que está de acordo com o referido por Benelli *et al.*, (2015), para este tipo de estruturas. Na zona central do *callus*, existe uma região de células com citoplasma mais denso e com um padrão de divisão organizado, cuja ampliação se apresenta na figura 26 – B, que correspondente a um embrião somático em fase globular. Aqui, importa salientar que, ao contrário do reportado pelos autores atrás referidos, que observaram a origem dos embriões somáticos nas células da epiderme dos *calli*, no nosso caso, estes parecem ter origem no interior dos mesmos.

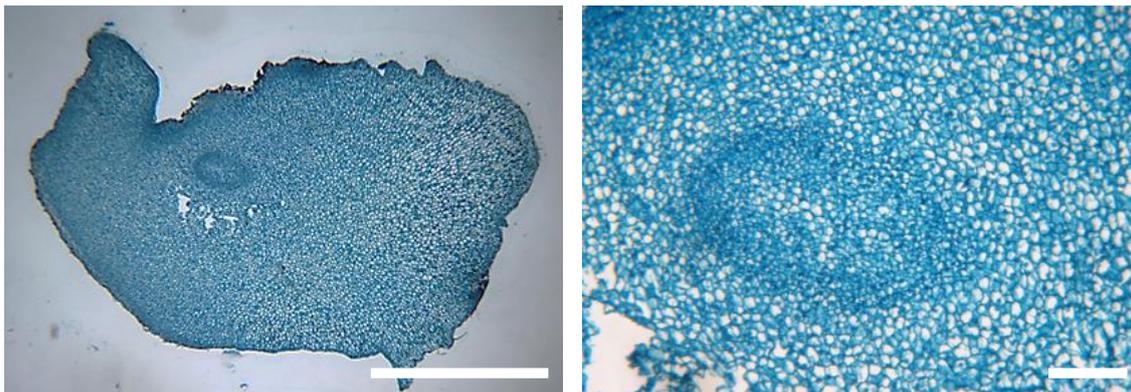


Figura 21 – *Calli* embriogénico de radícula (A). Ampliação da zona central do *calli* onde se evidencia a formação de uma estrutura embrionária (B). Barras: 500 μ m.

Na figura 22, apresenta-se um *callus* já com sinais evidentes de degeneração, do qual se destaca um embrião em fase globular. No embrião, está bem diferenciada a camada de células superficiais que caracterizam este tipo de estrutura, a protoderme, mas, ainda não se observa a formação do cilindro central descrito por Benelli *et al.*, (2015), que se diferencia aquando da evolução do embrião desta fase para as fases subsequentes, e que é o primeiro sinal de polaridade e diferenciação celular.

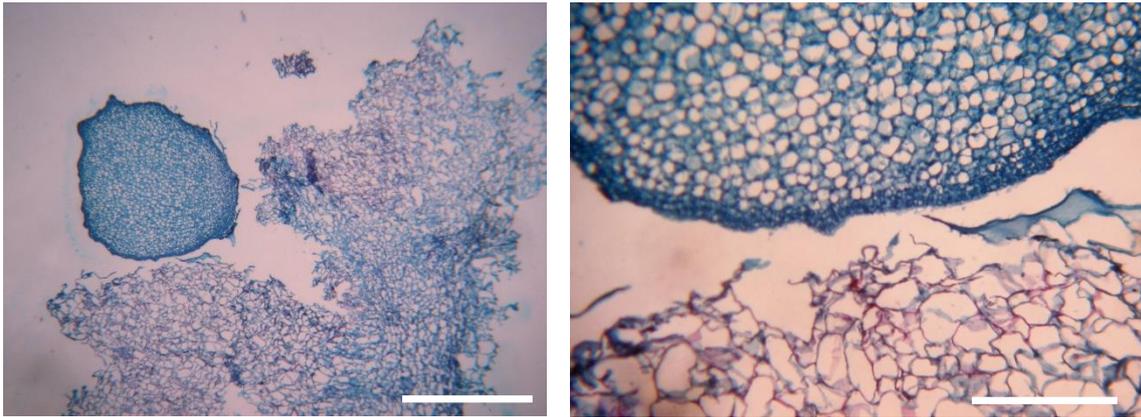


Figura 22- Em (A), *callus* embriogénico com embrião somático em fase globular e em (B), pormenor da zona mais externa do embrião onde se observa claramente a protoderme. Sinais evidentes de degeneração celular são visíveis no *callus* primário. Barras: 500 µm.

No final da segunda subcultura em meio OMc sem reguladores, verificou-se que os *calli*, independentemente do explante e das condições de cultura, começaram a perder capacidade de crescimento e a ficar necrosados (Figura 23), aspeto que também já tinha sido referido por Cerezo *et al.* (2011).

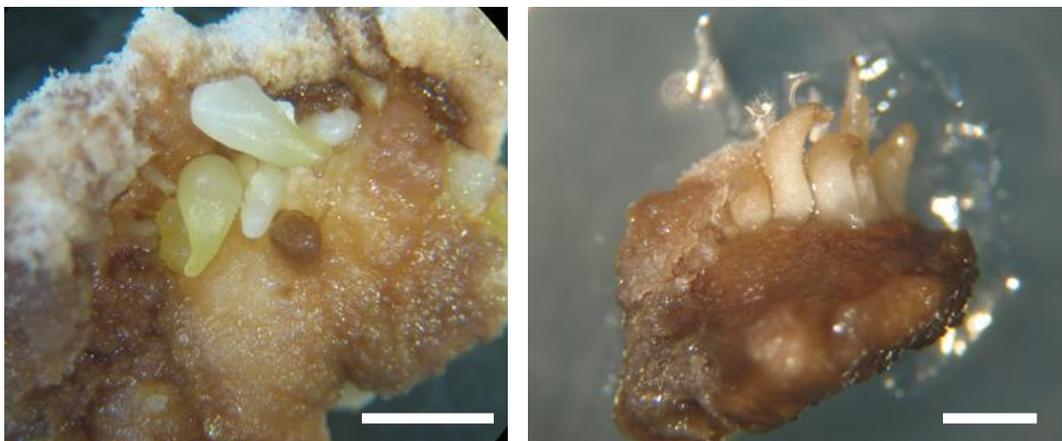


Figura 23: *Calli* de cotilédones proximais ao final de duas subculturas em meio de cultura OMc. Barra: 5 cm.

Deste modo, com o objetivo de recuperar a sua capacidade de proliferação e também visando induzir uma reposta de embriogénese cíclica, os *calli* existentes foram transferidos para meio ECO, de acordo com o proposto por Cerezo *et al.* (2011).

Trinta dias após a sua passagem para este meio, verificou-se que os *calli* recuperaram a sua capacidade de crescimento e manteve-se a produção de embriões, não havendo uma resposta diferenciada, nem em relação ao tipo de explante, nem às condições de cultura utilizadas (Tabela 9).

Tabela 9 - Resumo da análise de variância para o número de embriões formados na 1ª repicagem para meio ECO. As diferenças significativas foram registadas para valores de $p \leq 0,05$.

Variáveis	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	p
Tipo Explante	4.3259	2	2.16295	0.45486	0.636170
Luz	14.8279	1	14.82788	3.11822	0.081237
Explante*Luz	0.4845	2	0.24223	0.05094	0.950366
ERRO	380.4192	80	4.75524		

Numa segunda repicagem em meio ECO, os *calli* continuaram a proliferar e a produzir embriões, tendo nessa altura sido efetuada uma nova contagem do número de embriões formados. Do resultado da análise destes valores, que se apresenta na tabela 10, pode ver-se que o número de embriões conseguido foi fortemente influenciado tanto pelo tipo de explante, como pelas condições de cultura.

Tabela 10 - Resumo da análise de variância para o número de embriões obtidos no final da 2ª repicagem em meio ECO. As diferenças significativas foram registadas para valores de $p \leq 0,05$.

Variáveis	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	p
Tipo Explante	3801.17	2	1900.58	5.03412	0.010642
Luz	4401.05	1	4401.05	11.65715	0.001364
Explante*Luz	4387.88	2	2193.94	5.81113	0.005689
ERRO	16989.31	45	377.54		

Os intervalos de confiança obtidos após a análise de comparação de médias apresentam-se na figura 24. Como pode ver-se, o número de embriões aumentou

significativamente, em relação ao que se estava a conseguir em meio OMc sem reguladores, independentemente do tipo de explante utilizado, ou das condições de cultura. Em nenhuma situação o número médio de embriões formados por explante foi inferior a oito, e é de realçar o comportamento dos cotilédones distais na presença luz, que apresentam valores médios superiores a 50 embriões por explante. Este valor é superior ao conseguido com qualquer outro explante, independentemente das condições de crescimento.

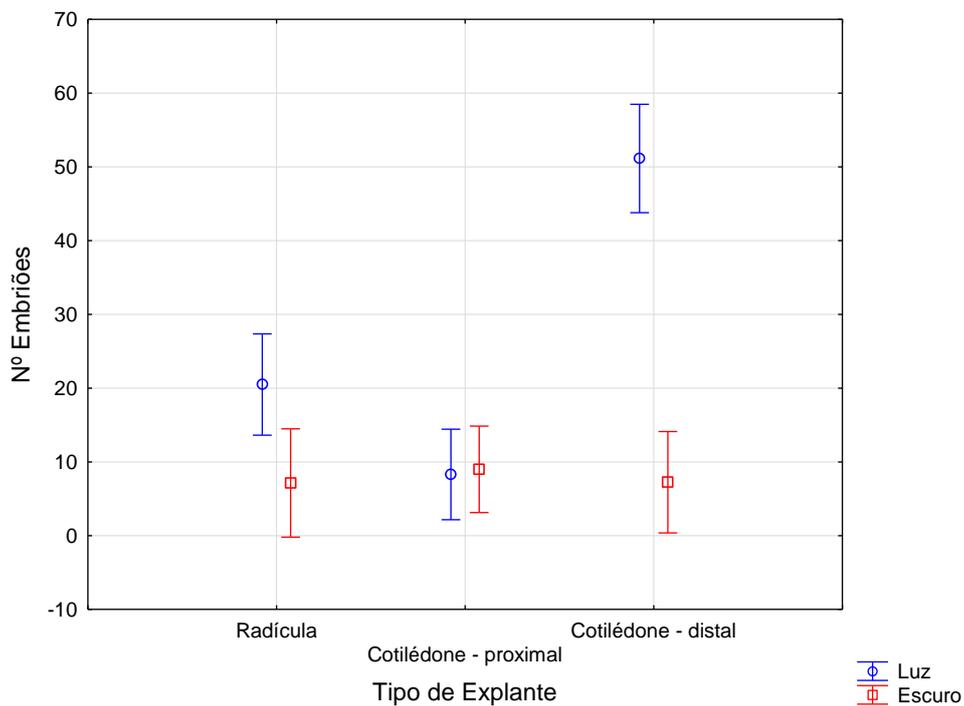


Figura 24 - Variação do número de embriões no final da segunda repicagem em meio ECO, em função do tipo de explante e condições de cultura (LSD 95%).

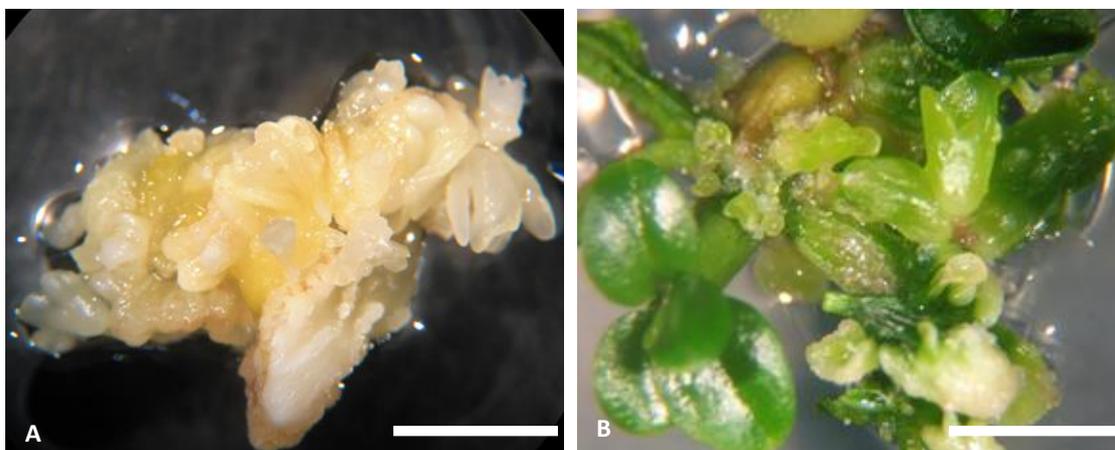


Figura 25 – Calli embriogénico de radícula em condição de escuro (A;) e de cotilédone distal na condição luz (B) em meio de cultura ECO. Barra: 5 cm.

Os resultados obtidos estão de acordo com os conseguidos por Cerezo *et al.* (2011) também com este meio de cultura. Também em concordância com o referido por estes autores, podemos observar que, as massas embriogênicas proliferaram em meio ECO e continuaram a formar embriões somáticos com uma cor creme clara (Figura 25 - A) quando estes se encontravam na condição escuro. Já na presença de luz, os *calli* apresentavam uma cor verde e os embriões amadureciam mais rapidamente (Figura 25 - B).

4.1.3. Maturação e germinação de embriões

Os embriões com mais de 3 mm, desenvolvidos tanto em meio OMc como em ECO, foram transferidos para meio OMc sem reguladores de crescimento. Passadas seis semanas em cultura, os embriões que foram colocados neste meio germinaram e converteram-se em plantas. Estes passos são ilustrados na figura 26. Em (A) pode ver-se um *callus* embriogénico com embriões já em fase cotiledonar, em (B) um embrião somático isolado e em (C) as plântulas evoluídas em meio OMc sem reguladores de crescimento.



Figura 26 – *Callus* embriogénico de cotilédone distal com embriões em várias fases de desenvolvimento (A); Embrião isolado em fase cotiledonar (B); Plantas provenientes de embriões de radícula no escuro em meio OMc sem reguladores de crescimento (C). Barra: 500 mm.

Foi também possível verificar que, em algumas das plântulas obtidas, se continuavam a produzir embriões somáticos (Figura 27). Esses embriões adventícios formavam-se sobretudo em folhas e raízes, e tinham capacidade para reiniciar novo ciclo de embriogénese. Situação idêntica tinha sido referida por Capelo *et al.* (2010) em

ensaios de embriogênese somática realizados com *Olea europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*.

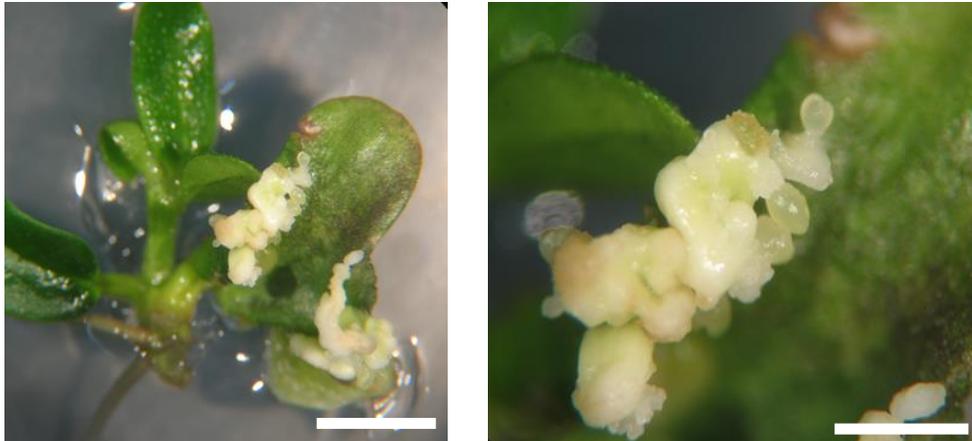


Figura 27 – Desenvolvimento de embriões somáticos adventícios formados em cotilédones distal em meio ECO. Barras: 5 mm.

4.1.4. Aclimatização

Depois das jovens plantas atingirem cerca de 10 cm de altura foram transferidas para tabuleiros alveolados. O facto de as plantas terem mantido um crescimento ativo em OMc demonstrou ser uma vantagem na fase de aclimatização.

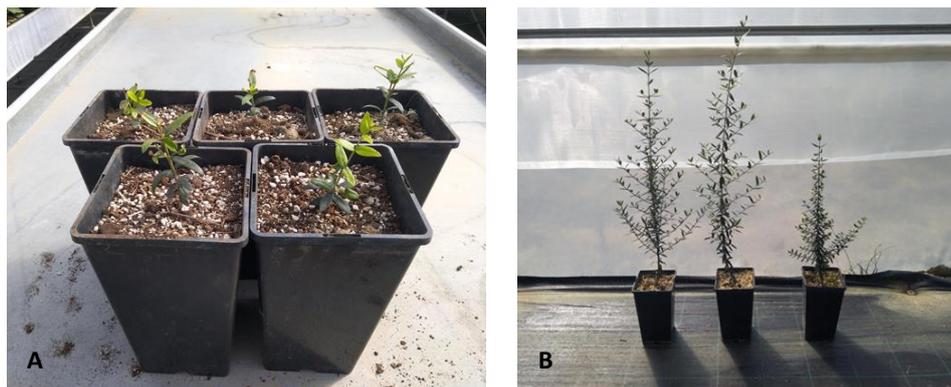


Figura 28 – Plantas em estufa provenientes de embriogênese somática. (A) Plantas após um mês a aclimatar; (B) Plantas após 6 meses de aclimatização.

No final da fase de aclimatização (Figura 28 - A) as plantas foram transferidas para uma estufa onde permaneceram durante 6 meses (Figura 28 - B) a fim de observar o seu desenvolvimento.

4.3. Ensaio com Pecíolos de Plantas em Cultura *In Vitro*

4.3.1. Fase de indução

Seguindo o proposto por Rugini e Caricato (1995), iniciou-se este ensaio com a colocação de pecíolos de folhas provenientes de plantas em cultura *in vitro*, em dois meios de cultura distintos, MS/2 e OMs suplementados de acordo com o descrito em materiais e métodos.

Como pode ver-se pelos resultados da análise de variância, apresentados na tabela 11, não houve diferenças significativas entre a taxa de calogénese obtida em qualquer um dos meios. Este resultado é confirmado pelos intervalos de confiança resultantes da análise de comparação de médias, que se apresenta na figura 29.

Tabela 11 - Resumo da análise de variância para a taxa de formação de *calli* em pecíolos. Diferenças significativas registadas pra valores de $p \leq 0,05$.

Variável	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	p
Meio	601.14	1	601.14	1.0874	0.309497
ERRO	11056.73	20	552.84		

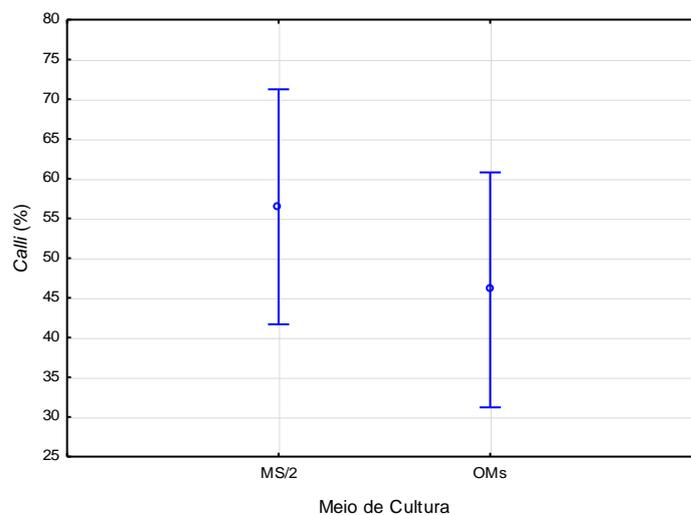


Figura 29 - Taxas de calogénese em função dos meios de cultura (LSD 95%).

A indução de calogénese é um aspeto fundamental em qualquer processo de embriogénese somática, e, neste caso, de acordo com o protocolo seguido, era importante conseguir além disso a diferenciação de rebentos adventícios sobre os *calli* formados. Isso foi conseguido em ambos os meios, ainda que em baixo número e sem diferenças significativas entre eles (Tabela 12). Em média obteve-se um rebento por explante no meio MS/2 e menos que um rebento no meio OMs (Figura 30).

Tabela 2: Valores de análise de variância em função do número de rebentos formados apresentando diferenças significativas para valores de $p \leq 0,05$.

Variável	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	p
Meio	0.72727	1	0.72727	0.326531	0.574075
ERRO	44.54545	20	2.22727		

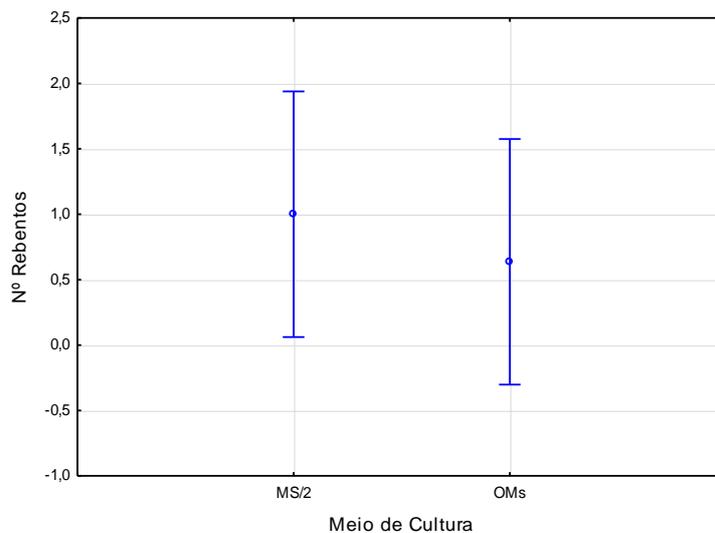


Figura 30 - Variação número de rebentos obtidos em função do meio de cultura (LSD 95%).

Relativamente ao desenvolvimento e diferenciação dos rebentos adventícios, observaram-se diferenças entre os dois meios de cultura testados. Os *calli* formados nos pecíolos cultivados em meio OMs, apresentaram um desenvolvimento reduzido (Figura 31 – A) e as estruturas neoformadas baixo grau de diferenciação (Figura 31 – B e C).



Figura 31 – Pecíolos ao final de duas semanas em meio de cultura OMs: (A) Pecíolo necrosado e com baixo desenvolvimento de *callus*; (B) e (C) Estruturas de primórdios foliares não expandidas. Barras: 500 µm.

Já nos pecíolos cultivados em meio MS/2 observou-se a formação de *calli* de maiores dimensões e nos rebentos adventícios formados diferenciaram-se pequenas folhas, como se demonstra na figura 32.



Figura 32 – Resultados de indução em meio MS. *Callus* duro e compacto mas com formação rudimentar de rebento (A); Pequenas folhas neoformadas em *callus* de estrutura mais friável (B) e (C). Barras: 500 µm.

Rugini e Caricato (1995) atribuem este melhor desenvolvimento dos *calli* e das estruturas neoformadas, no meio MS/2, à sua suplementação com TDZ. Também Mazri *et al.* (2013), em ensaios realizados em pecíolos e fragmentos de folhas da cv. ‘Dahbia’, referem o TDZ como a citocinina que conduziu aos melhores resultados na indução de *calli* embriogénicos e consequente formação de embriões somáticos. Sobre este assunto, Rugini e Silvestri (2016), referem que o TDZ é um importante indutor nos processos de embriogénese somática *in vitro*.

4.3.2. Fase de expressão

Na fase de expressão todas as estruturas neoformadas obtidas nos dois meios de cultura em estudo foram transferidas para meio de cultura OMe. Infelizmente o baixo número de folhas neoformadas obtidas não permitiu a instalação de um ensaio com a dimensão necessária, e, no final, a obtenção de embriões não foi conseguida.

4.2. Ensaio em Estames e Carpelos

Como referido em materiais e métodos, devido à inexistência de um protocolo com o qual já tivessem obtido resultados positivos em oliveira, os ensaios realizados com este tipo de explantes seguiram uma via exploratória, privilegiando o teste de variáveis, em detrimento de uma organização que permitisse uma análise exaustiva de resultados.

4.2.1. Fase de indução

As variáveis em análise nesta fase foram: o tipo de explante inicial (estames e carpelos), os estádios fisiológicos (pré-tétrada, tétrada e pós-tétrada), os meios de cultura (MS/2, OMc e NN) e as temperaturas de indução (5°, 25° e 30°C).

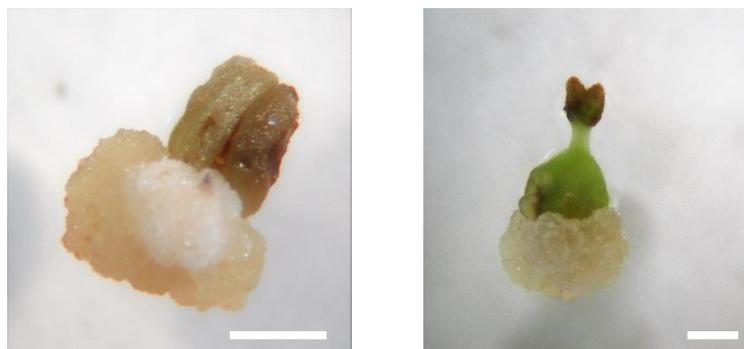


Figura 33 - Exemplos de *calli* contabilizados para ensaios: *Calli* em estame com origem no filete (A); *Calli* em carpelo, na base, na zona de corte (B). Barras: 5 mm.

O primeiro dado a reter é o facto de se ter conseguido induzir a formação de *calli* nos dois tipos de explantes utilizados (Figura 33). De qualquer modo a resposta conseguida em estames e em carpelos foi distinta como a seguir se mostra.

Como pode ver-se na tabela 13, onde se apresentam os valores da análise de variância para a formação de *calli* em estames, esta foi influenciada por todas as variáveis em estudo, estágio da microesporogénese, meios de cultura e temperatura.

Tabela 13 – Resumo da análise de variância para a percentagem de *calli* formados em estames. Diferenças significativas registadas para $p \leq 0,05$.

Variável	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	p
Estádio	15988	2	7994	9.476	0.000092
Meios	48483	2	24241	28.734	0.000000
Temperatura	14197	2	7098	8.414	0.000255
Estádio*Meios	8101	4	2025	2.401	0.049138
Estádio*Temperatura	17472	4	4368	5.177	0.000430
Meios*Temperatura	1319	4	330	0.391	0.815239
Estádio*Meios*Temperatura	3261	8	408	0.483	0.868376
ERRO	417612	495	844		

A análise dos intervalos de confiança para a interação tripla, que se apresenta na figura 34, mostra que os resultados mais interessantes se obtiveram com o meio MS/2, utilizando uma temperatura de 25°C, independentemente do estágio de evolução da microesporogénese. Bons resultados foram também obtidos com o meio referido numa temperatura de 30°C, ainda que neste caso as estames em pós-tétrada tenham registado resultados significativamente inferiores.

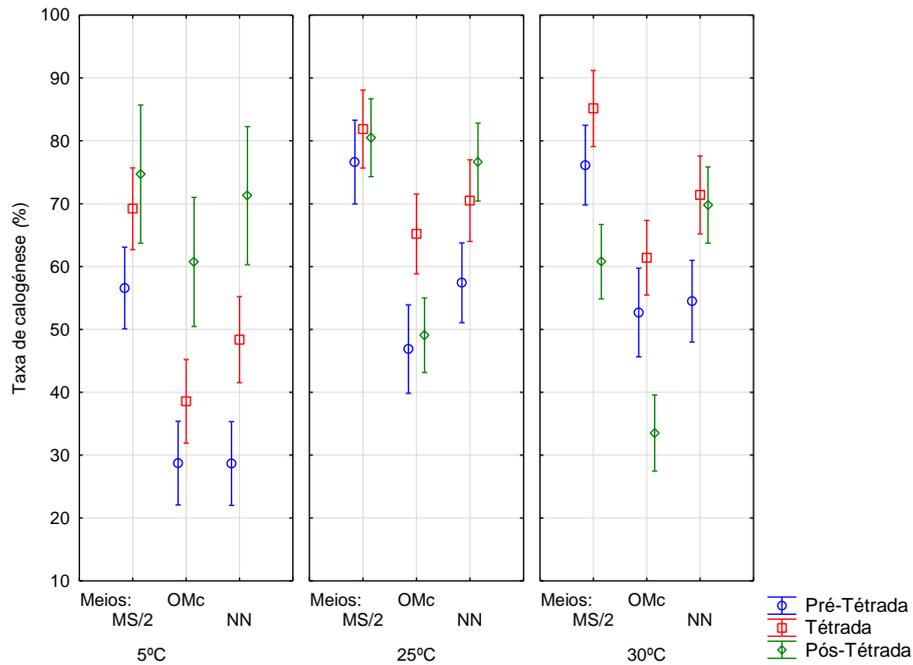


Figura 34 – Intervalos de confiança para a formação de *calli* em estames, em função dos meios de cultura, temperaturas de indução e estádios de desenvolvimento (LSD 95%).

No caso dos carpelos, como pode ver-se na tabela 14, a resposta foi menos influenciada pelas variáveis em estudo, só se registando diferenças estatisticamente significativas para os meios de cultura e a interação “estádio de evolução*temperatura”.

Tabela 14 – Resumo da análise de variância para formação de *calli* em carpelos. Diferenças significativas registadas para valores de $p \leq 0,05$.

Variáveis	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	p
Estádio	3255	2	1628	1.440	0.237987
Meios	104665	2	52333	46.292	0.000000
Temperatura	4940	2	2470	2.185	0.113573
Estádio*Meios	2543	4	636	0.562	0.690049
Estádio*Temperatura	12645	4	3161	2.796	0.025641
Meios*Temperatura	2172	4	543	0.480	0.750195
Estádio*Meios*Temperatura	4343	8	543	0.480	0.870376
Error	560717	496	1130		

Da análise dos intervalos de confiança, que se apresentam na figura 35, verificamos que os melhores resultados se obtêm, em meio MS/2 para a temperatura de 30°C e para os estádios de evolução equivalentes a tétrada e pré-tétrada.

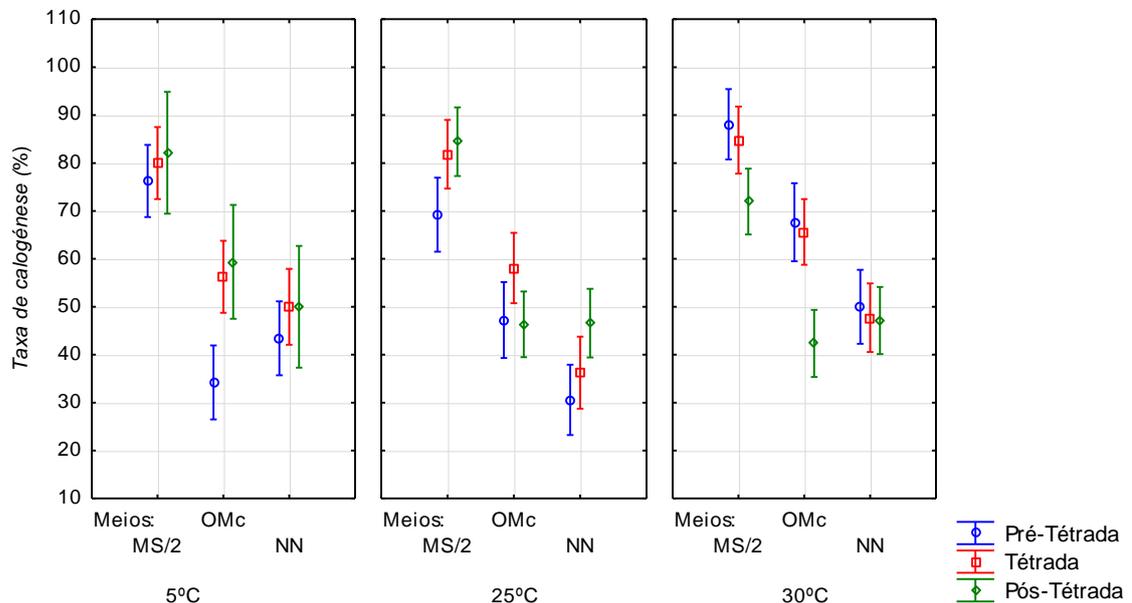


Figura 35 - Variação da percentagem de formação de *calli* em carpelos, em função dos meios de cultura, temperatura e estágio (LSD 95%).

4.2.1.1. Estrutura

Os *calli* formados foram avaliados em relação à sua estrutura, tendo-se identificado dois tipos, *calli* friáveis e *calli* compactos. A figura 36 ilustra os dois tipos de *calli* obtidos.

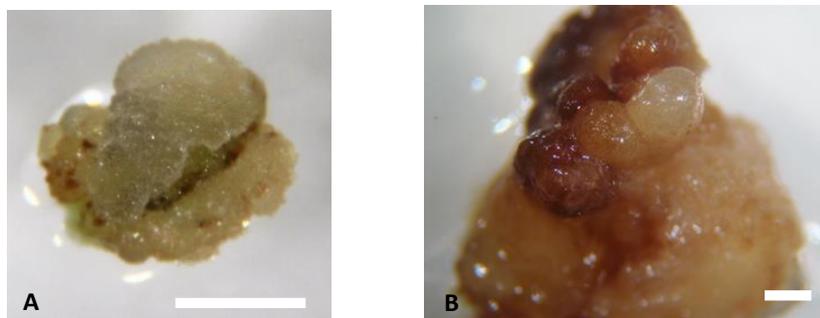


Figura 36 - Exemplos dos tipos de *calli* observados. (A) Estame com *callus* friável em meio de cultura MS/2; (B) Estame com *callus* compacto em meio de cultura OMc. Barra: 5 mm

Como pode ver-se na figura 37, o meio de cultura influenciou significativamente o tipo de *calli* obtido nos estames. Enquanto no meio MS/2 se obtiveram principalmente *calli* friáveis, nos outros meios de cultura os *calli* obtidos foram compactos.

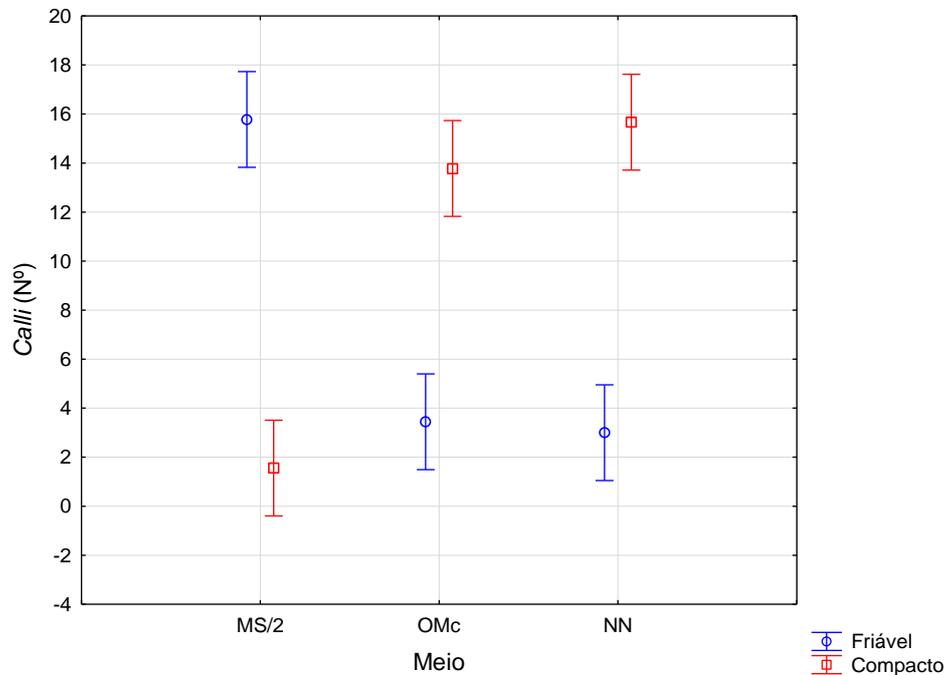


Figura 37 – Intervalos de confiança para o número de *calli* em função da estrutura e do meio de cultura (LSD 95%).

Relativamente aos carpelos, independentemente do meio de cultura utilizado, a maioria dos *calli* formados foram compactos e as temperaturas de indução com melhores resultados, foram os 25 e 30°C, sem diferenças entre si (Figura 38).

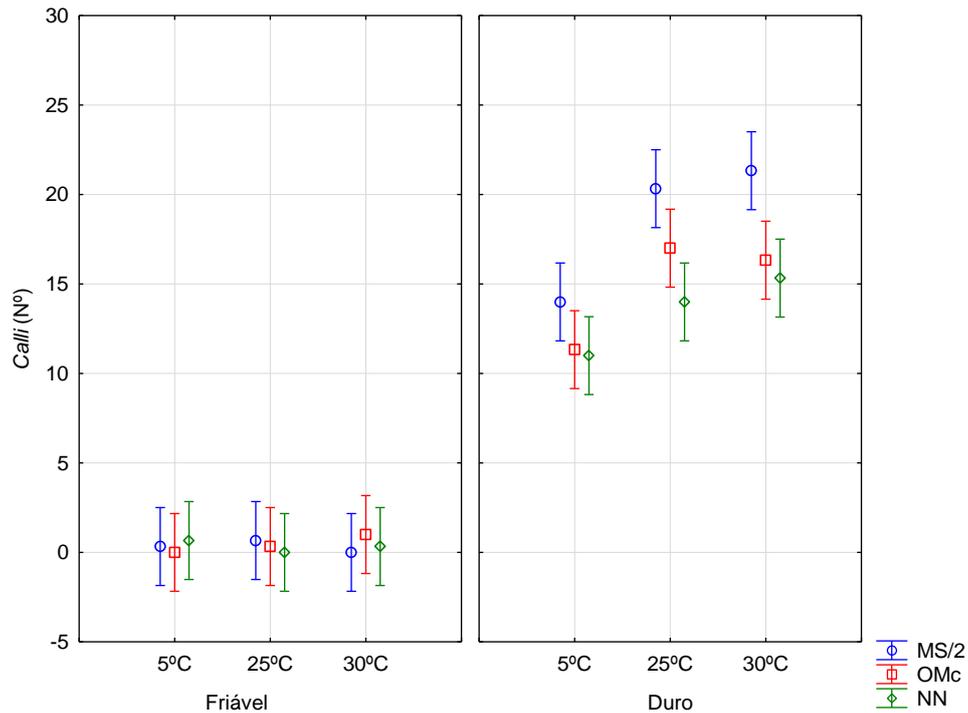


Figura 38 - Variação da estrutura de *calli* de carpelos em função dos meios de cultura e temperaturas de indução (LSD 95%).

Os resultados obtidos estão de acordo com Rugini e Caricato (1995) e Capelo *et al.* (2010), que referem nos seus ensaios em oliveira, que os explantes formaram maioritariamente *calli* de tipo duro e compacto.

4.2.1.4. Cor dos *Calli*

Também se fez o registo da cor dos *calli* nos dois tipos de explante, considerando-se três tipos de cores predominantes: branco, castanho ou amarelado.

A análise da interação “meio*cor” (Figura 39 – A e B) permite concluir que os *calli* formados, independentemente do tipo de explante, foram predominantemente brancos (Figura 40).

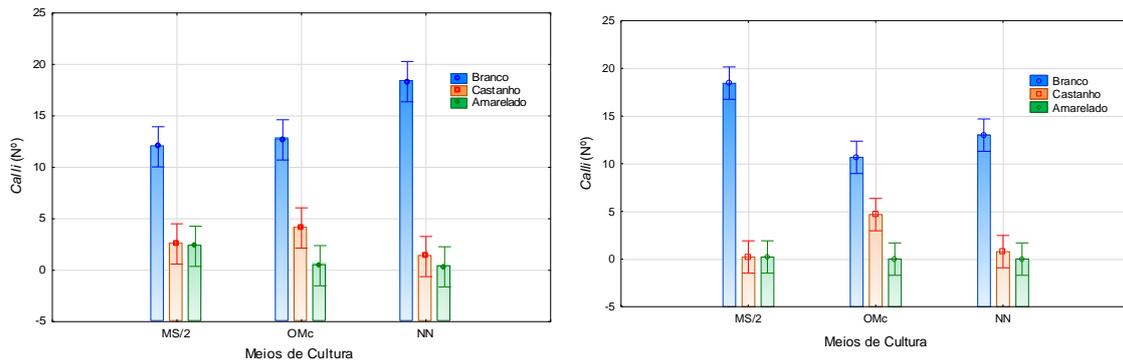


Figura 39- Número de *calli* obtidos para as três cores consideradas, em função do meio de cultura em (A) Carpelos e (B) Estames. As barras de erro representam o desvio padrão da amostra.

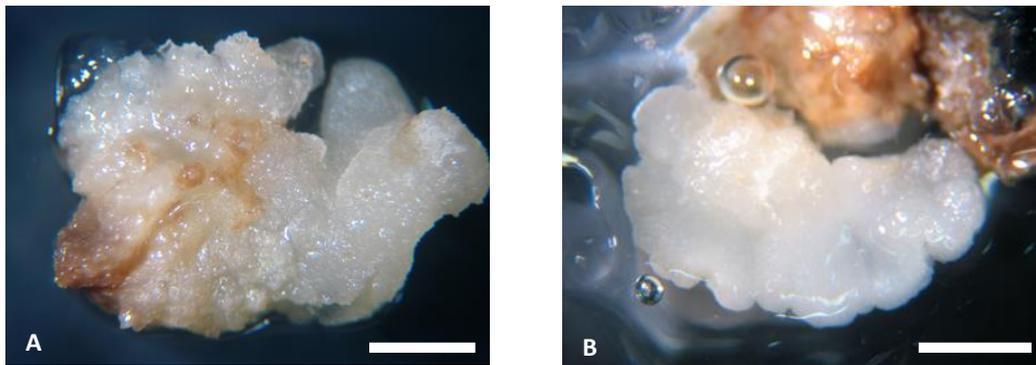


Figura 40 - Aspetto dos *calli* de coloração branca obtidos em estames, correspondendo (A) a um *callus* friável e (B) a um *callus* compacto. Barras: 5 mm.

Este resultado está de acordo com o obtido por Mazri *et al.* (2001). Estes autores referem que nos seus ensaios os *calli* formados em todos os explantes em estudo eram predominantemente brancos.

4.2.2. Fase de expressão

Nesta fase os *calli* obtidos na fase de indução foram transferidos para os mesmos meios de cultura sem suplementação em reguladores de crescimento ou com concentrações em auxinas reduzidas, como referido em materiais e métodos. Só foram selecionados *calli* com origem em tecido diploide (filete dos estames e base do carpelo).

Os *calli* em meio de cultura OMc com o passar das semanas foram-se tornando cada vez mais duros, e quando repicados o crescimento celular tornou-se cada vez mais reduzido acabando os *calli* por necrosar (Figura 41), o mesmo acontecendo com os *calli* provenientes de meio de cultura NN (Figura 42).

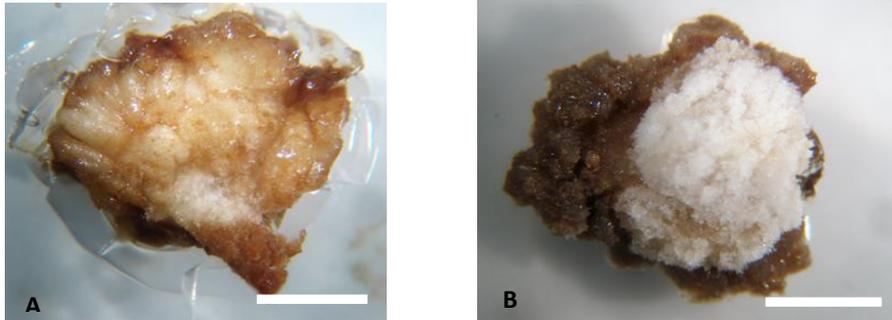


Figura 41 – Explantes em meio de cultura OMc sem reguladores de crescimento no final da fase de expressão: Estame pós-tétrada com temperatura de indução de 30°C (A); Carpeló pós-tétrada com temperatura de indução de 30°C (B). Barras: 5mm.

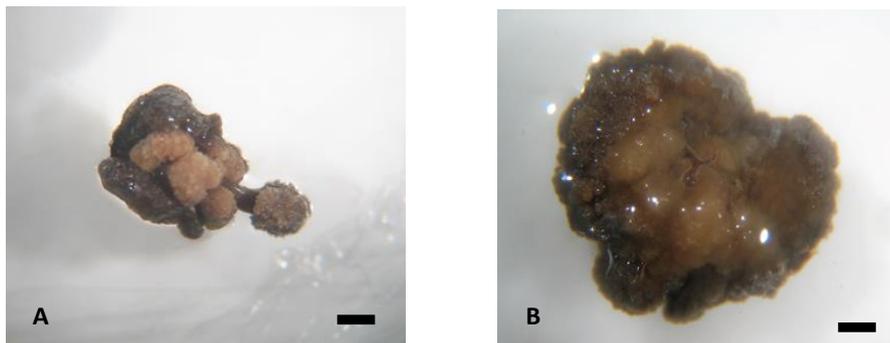


Figura 42 - Explantes em meio NN ao fim de 4 semanas em meio NN sem reguladores de crescimento: Estame téttrada com tratamento a 25°C (A); Carpeló téttrada com tratamento a 30°C (B). Barras: 500 µm.

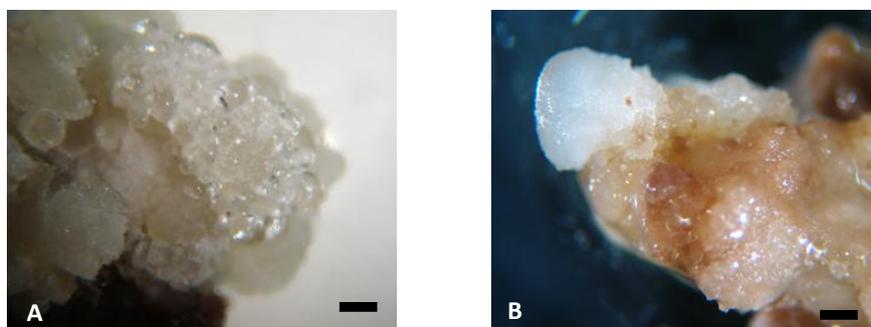


Figura 43 – Explantes em meio MS/2 sem reguladores de crescimento no final da fase de expressão: *Calli* de carpelo pré-tétrada com indução 25° C (A); *Calli* de filete pré-tétrada com tratamento de 30°C (B). Barras: 500 µm.

Só nos *calli* transferidos para meio MS/2 foi possível manter uma continuação de crescimento nesta fase, inclusive com o desenvolvimento de estruturas globulares (Figura 43), muitas vezes relacionadas com o aparecimento de competência embriogénica, mas, no final não se conseguiu em nenhum caso o desenvolvimento de embriões somáticos.

5. CONCLUSÃO

Um protocolo para regeneração de plantas por embriogénese somática na espécie *Olea europaea* cv. 'Galega vulgar' foi conseguido com sucesso em material juvenil. Nas condições testadas, embriões zigóticos provenientes de sementes maduras, conseguiram com sucesso desenvolver embriões somáticos. Os explantes que apresentaram maior percentagem de calogénese na fase de indução foram os cotilédones proximais, seguidos das radículas, ainda que na fase de expressão tenham sido os cotilédones distais a apresentar um maior número de embriões somáticos. No final da fase de indução foi possível observar a neoformação de raízes, evento que precedeu o aparecimento de embriões somáticos. Sobre este assunto, ainda que não tenham sido apresentados dados que o confirmem, pois a ocorrência deste evento foi inesperada, o desenvolvimento de raízes adventícias pareceu determinante para o posterior desenvolvimento de embriões somáticos. No que se refere aos meios de cultura utilizados neste protocolo, ambos apresentaram resultados positivos na obtenção de embriões somáticos, porém o meio de cultura ECO permitiu um rejuvenescimento dos *calli* e o desenvolvimento de embriogénese somática repetitiva.

Relativamente às condições de cultura, a luz na fase de indução permitiu uma maior formação de raízes adventícias em todos os explantes. Já referente à formação de embriões somáticos, as duas condições em estudo não demonstraram diferenças significativas entre si, porém, os dois tipos de cotilédones revelaram um maior número de embriões desenvolvidos quando colocados no escuro.

O material adulto mostrou-se recalcitrante, tal como relatado em outras variedades da mesma espécie, contudo, em pecíolos foi possível obter a neoformação de estruturas foliares, passo considerado essencial para a obtenção de embriões somáticos de acordo com o protocolo adotado neste trabalho.

Tendo em conta os resultados obtidos, é possível antever perspectivas animadoras para a obtenção de um protocolo de embriogénese somática em material adulto, porém, é necessário continuar o trabalho aqui iniciado, de forma a compreender as adaptações necessárias para a cv. 'Galega vulgar', tanto ao nível do explante utilizado, como das formulações dos meios e condições físicas da cultura.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ammirato, P. V. (1993). Embryogenesis. In: Evans, D. A. Sharp, W. R.; Ammirato, P. V. Yamada, Y. eds. "Handbook of Plant Cell Culture". *Publicação*: MacMillan, Nova Iorque, p. 970.

Anami, S., Njuguna, E., Coussens, G., Aedaert, S. e Lijsebettens, M. (2013). Higher plant transformation: principles and molecular tools. *The International Journal of Developmental Biology* 57: 483-494.

Bao, Z.H., Ma, Y.F., Liu, J.F., Wang, K.J., Zhang, P.F., Ni, D.X. and Yang, W.Q., 1980. *Induction of plantlets from the hypocotyl of Olea europaea L. in vitro*. *Acta Botanica Sinica* 2: 96-97.

Benelli, C., Fabbri, A., Grassi, S., Lambardi, M. e Rugini, E. (2001). *Histology of somatic embryogenesis in mature tissues of olive (Olea europaea L.)*. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 76 (1), pp. 112-119.

Besnard, G. & Bervillé, A. (2000). Multiple origins for Mediterranean olive (*Olea europaea* L. ssp. *Europaea*) based upon mitochondrial DNA polymorphisms. *Molecular Life Sciences* 323: 173-181.

Besnard, G., Khadari, B., Baradat, P. e Bervillé, A. (2002). *Olea europaea* (Oleaceae) phylogeography based on chloroplast DNA polymorphism. *Theor Appl Genet* 104: 1353-1361.

Bewley, J. e Black, M. (1985). Seeds: physiology of development and germination. *Plenum* p. 101.

Bradaï, F., Pliego-Alfaro, F. e Sánchez-Romero, C. (2016). Somaclonal variation in olive (*Olea europaea* L.) plants regenerated via somatic embryogenesis: Influence of genotype and culture age on phenotypic stability. *Scientia Horticulturae* 213: 208-215.

- Brhadda, N., Abousalim, A. e Walali, L.D.E. (2003). Effets du milieu de culture et de la lumière sur l'embryogenèse somatique de l'olivier (*Olea europaea* L.) cv. 'Picholine Marocaine'. *Fruits* 58: 167-174.
- Cañas, L. A. e Benbadis, A. (1988). In vitro plant regeneration from cotyledon fragments of the Olive tree (*Olea europaea* L.) *Plant Science* 54: 65-74.
- Canhoto, J. M. e Cruz, G. S. (1994). Improvement of somatic embryogenesis in Feijoa sellowiana Berg (*Myrtaceae*) by manipulation of culture media composition. *In Vitro Cell* 30: 21-25.
- Canhoto, J. M., Lopes, M. L. e Cruz, G. S. (1999). Somatic embryogenesis in myrtaceous plants. *Somatic Embryogenesis in Woody plants* Vol. 4, pp. 293-340.
- Canhoto, J. (2010). Biotecnologia Vegetal da Clonagem de Plantas à Transformação Genética. Editora: Pombalina. Universidade de Coimbra.
- Cantliffe, D. J. (1992). Somatic embryos in sweetpotato. In: HILL, W. A.; Bonsi, C. K.; Loretan, P. A. eds. Sweetpotato technology for the 21th century. Tuskegee University, pp. 39-46.
- Cardoso, H. (2006). *Transformação genética de Vitis vinífera L. castas 'Trincadeira' e 'Aragonez' para a introdução de resistência ao fungo Uncinula necator (Sch.) Burrill*. Tese de Doutoramento, Universidade de Lisboa.
- Cerezo, S., Mercado, J. A. e Pliego-Alfaro, F. (2011). An efficient regeneration system via somatic embryogenesis in Olive. *Plant Cell Tiss Organ Culture* 106: 337-344.
- Chee, R.P. e Cantliffe, D.J. (1988). Selective enhancement of Ipomoea batatas Poir. embryogenic and nonembryogenic callus growth and production of embryos in liquid culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 15: 149-159.
- Cheong, E. J. e Pooler, M. R. (2004). Factors affecting somatic embryogenesis in *Prunus incisa* cv. February Pink. *Plant Cell Reports* 22: 810 – 815.

- Chiappetta e Muzzalupo (2012). Olive Germplasm – The olive cultivation, table olive and olive oil industry in Italy, pp. 23-38.
- Christianson, M.L. (1985). An embryogenic culture of soybean: towards a general theory of somatic embryogenesis. In: Henke, R. R., Hughes, K. W., Constatin, M. J., Hollaender, A. (eds). "Tissue Culture in Forestry and Agriculture". Nova Iorque: Plenum Press, pp. 83-103.
- Chu, C. C., C. S. Sun, X. Chen, W. X. Zhang e Du Z. H. (1984). Somatic embryo- genesis and plant regeneration in callus from inflorescences of *Hordeum vulgare* X *Triticum aestivum* hybrids. *Theoretical and Applied Genetics* 68: 375— 379.
- Corredoira, E., Ballester, A. e Vieitez, M. (2003). Proliferation, Maturation and Germination of *Castanea sativa* Mill. Somatic Embryos Originated from Leaf Explants. *Annals of Botany* 92: 129-136.
- Corredoira, E., Ballester, A., Ibarra, M. e Vieitez, A. M. (2015). Induction os somatic embryogenesis in explants of shoot cultures established from adult *Eucalyptus globulus* and *E. saligna* x *E. maidenii* trees. *Tree Physiology* 35: 678-690.
- Dunstan, D. I., Tautorus, T. E. e Thorpe, T. A. (1995). Somatic Embryogenesis in Woody Plants. *In Vitro Embryogenesis in Plants* pp. 471-538.
- Fehér, A. (2015). Somatic embryogenesis – Stress – induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta* 1849: 285 – 402.
- Fernández, I., (2002). Efecto de los reguladores de crecimiento en los procesos de organogénesis y embriogénesis somática de aguacate (*Persea americana* Mill.). Universidade de Colima. Doutorado em Ciências: Áreas ciências agrícolas e florestais.

- Filonova, L. e Arnold, P. (2000). Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 51, 343: 249-264.
- Floh, E., Santos, A. e Demarco, D. (2015). Embriogénese vegetal: abordagens básicas e biotecnológicas.
- Frederico, A., Campos, M., Cardoso, H., Imani, J. e Arnholdt-Schmitt, B. (2009). Alternative oxidase involvement in *Daucus carota* somatic embryogenesis. *Physiologia Plantarum* 137: 498 – 508.
- Gamborg, O.L. Miller, R.A. e Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50: 151-158.
- Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D. M. e Thorpe, T. (1996). Plant Hormones and Plant Growth Regulators in Plant Tissue Culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 32: 272-289.
- Gaspar. T., Kevers, C., Bisbis, B., Franck, T., Crèvecoeur, M., Greppin, H. e Dommes, J. (2000). Loss of plant organogenic totipotency in the course of *in vitro* neoplastic progression. *In Vitro Cell Developmental Biology – Plant* 36: 171 – 181.
- Gaspar, T., Kevers, C., Faivre-Rampant, o., Crèvecoeur, M., Penel, C., Greppin, H. e Dommes, J. (2002). Changing concepts in Plant Hormone Action. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 39: 85-106.
- Gleddie, S., Keller, W. e Setterfield, G. (1983). Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants and cell suspensions of *Solanum melongena* L. (eggplant). *Canadian Journal Botany* 61: 656-666.
- Goldberg, R.B. (1988). Plants: novel developmental processes. *Science*, 240 (4858), pp. 1460-1467.

- Guerra, M.P., Torres, A.C. e Teixeira, J.B. (1999). Embriogénese Somática e Sementes Sintéticas. In: Torres, A.C., Caldas, L.S., Buso, J.A. (eds.). "Culturas de Tecidos e Transformação Genética de Plantas". Brasília, Embrapa-CBAB, volume 2, pp. 533-568.
- Guha, S. e Maheshwari, S.C. (1964). In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 204: 297.
- Halperin, W. e Wetherell, D.F. (1965). Ammonium requirement for embryogenesis in vitro. *Nature* 201: 519-520.
- Hay, E. e Charest, E. (1999). Somatic Embryo Germination and Desiccation Tolerance in Conifers. *Somatic Embryogenesis en Woody Plants* Vol. 4, pp. 61-96.
- Hernández, I., Cuenca, B., Carneros, E., Alonso-Blázquez, N., Ruiz, M., Celestino, C., Ocaña, L., Alegre, J. & Toribio, M. (2011). Application of Plant Regeneration of Selected Cork Oak Trees by Somatic Embryogenesis to Implement Multivarietal Forestry for Cork Production. *Tree and Forestry Science and Biotechnology*. Global Science Books.
- Hu, C. e Wang, P. (1986). Embryo culture: Technique and applications. *Handbook of Plant Cell Culture: Techniques and Applications* Vol. 4, pp. 43-96.
- Husaini, A., Mercado, J., Teixeira da Silva, J. e Schaart, J. (2001). Review of Factors Affecting Organogenesis, Somatic Embryogenesis and *Agrobacterium tumefaciens* – Mediated Transformation of Strawberry. *Genes, Genomes and Genomics*. Global Science Books.
- Husaini, A.M, Abdin, M.Z. (2007). Interactive effect of light, temperature and TDZ on the regeneration potential of leaf discs of *Fragaria × ananassa* Duch. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 43: 576-584.
- Karami, O., Aghavaisi, B. e Pour, A. (2009). Molecular aspects of somatic-to-embryogenic transition in plants. *Journal of Biological Chemistry* 2: 177-190.

- Kendurkar, S. V., Kadganda, R. S., Phadke, C. H., Jana, M. M., Shirke, S. V. e Mascarenhas, A. F. (1995). Somatic embryogenesis in some Woody angiosperms. *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, Vol. 1, pp. 49-79.
- Kevers, C., Strasser, R., Franck, T. e Dommes, J. (2004). Hyperhydricity of Micropropagated Shoots: A Typically Stress-induced Change of Physiological State. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* Vol. 77, Nº. 2, pp. 181-191.
- Koch, M., Tanami, Z. e Salomon, R. (1995). Improved regeneration of shoots from garlic callus. *HortScience* 71: 995-1000.
- Lazzeri, P.A., Hildebrand, D.F., Sunega, J., Williams, E.G., e Collins, G.B. (1988). Soybean somatic embryogenesis: interactions between sucrose and auxin. *Plant Cell Reports* 7: 517.
- Leva, A. e Sink, K. C. (1990). Differential aspects of sucrose, glucose and fructose during somatic embryogenesis in *Asparagus*. *Journal Plant Physiol* 137: 184-189.
- Leva, A., Muleo, R. e Petrucelli, R. (1995). Long-term somatic embryogenesis from immature olive cotyledons. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 70: 417-421.
- Long, L. M., Preece J. E. e Sambeek, J. W. (1995). Adventitious regeneration of *Juglans nigra* L. (eastern black walnut). *Plant Cell Reports* 14: 799-803.
- Mazri, M. A., Elbakkali, A., Belkou, M. & Belkoura, I. (2011). Embryogenic competence of calli and embryos regeneration from various explants of Dahbia cv, a Moroccan olive tree (*Olea europaea* L.). *African Journal of Biotechnology* Vol. 10 (82), pp. 19089-19095.
- Mazri, M.A., Belkoura, I. e Pliego-Alfaro, F. (2013). Somatic embryogenesis from leaf and petiole explants of the Moroccan olive cultivar Dahbia. *Scientia Horticulturae* 159: 88-95.

- Mencuccini, M., Corona, C. e Mariotti, D. (1991). Plant regeneration and first attempt of in vitro genetic improvement of olive (cv. Moraiolo). *Acta Horticulturae* 300: 261-264.
- Merkle, S.A., Parrot, W.A. e Flinn, B.S. (1995). Morphogenic Aspects of Somatic Embryogenesis. *In Vitro Embryogenesis in Plants*, pp. 155-203.
- Mitrakos, K., Alexaki, A. e Papadimitriou, P. (1992). Dependence of olive morphogenesis on callus. *Journal of Plant Physiology* 139: 269-273.
- Murashige, T. e Skoog, F. A. (1962). Revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 1: 437-496.
- Narayanaswamy, S. e Norstog, K. (1964). Plant embryo culture. *The Botanical Review* 30 (4), pp. 587-628.
- Okamura, S., Miyasaka, K. e Nishi, A. (1973). Synchronization of carrot cell culture by starvation and cold treatment. *Experimental Cell Research* 78: 467 – 470.
- Orinos, T. e Mitrakos, K. (1991). Rhizogenesis and somatic embryogenesis in calli from wild olive (*Olea europaea* var. *sylvestris* (Miller) Lehr) mature zygotic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 27: 183-187.
- Parrott, W.A., Merkle, S.A., e Williams, E.G. (1991). Somatic embryogenesis: potential for use in propagation and gene transfer systems, in “Advanced Methods in Plant Breeding and Biotechnology”, Murray, D.R., Ed., CAB International, Wallingford: 158.
- Pérez, M., Bueno, A., Escalona, M., Toorop, P., Rodríguez, R. e Cañal, M. (2013). Temporary immersion systems (Rita®) for the improvement of cork oak somatic embryogenic culture proliferation and somatic embryo production. *Trees* 27: 1277-1284.

- Peixe, A. (2002). *Estudo sobre a aplicação de duas técnicas de haploidização (androgénese in vitro e partenogénese in situ) em prunoideas*. Tese de Doutoramento, Universidade de Évora, p. 166.
- Pinto, G., Santos, C., Neves, L. e Araújo, C. (2002). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus* Labill. *Plant Cell Reports* 21: 208-213.
- Quiroz-Figueroa, F. R., Rojas-Herrera, R., Galaz-Avalos, R. M. e Loyola-Vargas, V. M. (2006). Embryo production through somatic embryogenesis can be use to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 86: 285-301.
- Rabéchault, H., Guénin, G. e Ahée, J. (1970). Recherches sur la culture *in vitro* des embryons de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq. Var. *dura* Becc.). VII. Comparasion de divers milieux minéraux. *Oleagineux* 25: 519-524.
- Raemakers, K., Jacobsen, E., e Visser, R. (1999). Proliferative Somatic Embryogenesis in Woody Species. *Somatic Embryogenesis in Woody Plants* vol. 4, pp. 29-59.
- Rallo, L., Barranco, D., Díez, C. M., Rallo, P., Suárez, M., Trapero, C. & Pliego-Alfaro, F. (2018). Strategies for Olive (*Olea europaea* L.) Breeding: Cultivated Genetic Resouces and Crossbreeding. Chapter 14.bRecalcitrance; An Introduction. *In Vitro Cell Developmental Biology – Plant* 36: 141.
- Reinert, J. (1958). Morphogenese und ihre kontrolle an geweberkulturen aus karotten. *Naturwissenschaften* 45: 344- 345.
- Reinert, J. Tazawa, M. e Semenoff, S. (1967). Nitrogen compounds as factors of embryogenesis in vitro (*Daucus carota* tissue culture). *Nature* 216: 1215-1216.
- Reiser, L. e Fischer, R. (1993). The ovule and the Embryo Sac. *The Plant Cell*, vol. 5, pp. 1291-1301.
- Rugini, E. (1986). Olive (*Olea europaea* L.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 1, Springer Verlag, pp. 253- 266.

- Rugini, E. e Tarini, P. (1986) Somatic embryogenesis in olive (*Olea europaea* L.). In: Moet Hennessy (Ed.), Proceedings Conference Fruit Tree Biotechnology - Paris (França) p. 62.
- Rugini, E. (1988). Somatic embryogenesis and plant regeneration in olive (*Olea europaea* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 14: 207-214. Kluwer Academic Publishers, Holanda.
- Rugini, E. e Caricato, G. (1995). Somatic embryogenesis and plant recovery from mature tissues of olive cultivars (*Olea europaea* L.) 'Canino' and 'Moraiolo'. *Plant Cell Reports* 14: 257-260.
- Rugini, E. e Silvestri, C. (2016). Somatic Embryogenesis in Olive (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *sativa* and var. *silvestris*). In Germanà, Maria Antonietta – “*In vitro Embryogenesis in Higher Plants, Methods in Molecular Biology*” pp. 341-349.
- Sass, J.E. (1958). Botanical microtechnique. The Iowa State University Press, Ames.
- Schenk, R.O. e Hildebrandt, A.C. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany* 50: 199-204.
- Shibli, R. A., Shatnawi, M., Abu-Ein e Al-Juboory, K. H. (2001). Somatic embryogenesis and plant recovery from callus of Nabali Olive (*Olea europea* L.). *Scientia Horticulturae* 88: 243-256.
- Sondahl, M. e Sharp, W.R. (1977). High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. *Z. Pflanzenphysiol* 81: 395-408.
- Steward, F.C., Mapes, M.O. e Mears, K. (1958). Growth and organized development of cultured cells. I. Organization in cultures from freely suspended cells. *American Journal Botany* 45: 705-708.
- Sugiyama, M., (1999). Organogenesis in vitro. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 61-64.

- Tazawa, M. e Reinert, J. (1969). Extracellular and intracellular chemical environments in relation to embryogenesis in vitro. *Protoplasma* 68: 157-173.
- Tulecke, W. e McGranahan, G. (1985). Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledons of walnut, *Juglans regia* L. *Plant Science* 40: 57-63.
- Verhagen, S.A. e Wann, S.R. (1989). Norway spruce somatic embryogenesis: high frequency initiation from light-cultured mature embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 16: 103-111.
- von Arnold, S. e Hakman, I. (1988). Plantlet regeneration in vitro via adventitious buds and somatic embryos in Norway spruce (*Picea abies*). *Genetic manipulation of Woody Plants. Basic Life Sciences* 44: 199-215.
- White, P. R. (1943). *A Handbook of Plant Tissue Culture*. The Jacques Cattell Press.
- Williams, E. G. e Maheswaran, G. (1986). Somatic embryogenesis factors influencing coordinated behaviour of cells as na embryogenic group. *Annals of Botany* 57: 443-462.
- Yeung, E. C. (1995). Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. *In Vitro Embryogenesis in Plants*, pp. 205-247.
- Zhang, Y. X. e Lespinasse, Y. (1992). Haploidy. *Biotechnology of Perennial Fruit Crops*, pp. 57-75.

ANEXO

Composição dos meios de cultura

Componentes	OM	OMc	OMe	MS	NN
Macronutrientes	(Rugini, 1984)	(Cañas e Benbadis, 1988)	(Cañas e Benbadis, 1988)	(Murashige e Skoog, 1962)	(Nitsch & Nitsch, 1969)
KNO ₃	1100	950	275	1900	950
NH ₄ NO ₃	412	720	103	1650	720
CaCl ₂ · 2H ₂ O	-	166	110	440	166
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	600		150		
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1500	185	375	370	185
KH ₂ PO ₄	340	68	85	170	68
Micronutrientes					
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22,3	22,3	5,58	16,9	18,9
H ₃ BO ₃	12,4	12,4	3,1	6,2	10
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	14,3	14,3	3,58	8,6	12,3
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25	0,25	0,06	0,25	0,25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,25	0,25	0,06	0,025	0,025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025	0,025	0,006	0,025	-
KI	0,83	0,83	0,208	0,83	-
Fe-EDTA					
FeSO ₄ · 7H ₂ O	41,3	27,8	6,95	27,8	27,8
Na ₂ EDTA	27,8	37,5	9,38	37,2	37,2
Vitaminas					
Myo-inositol	100	100	50	50	100
Glicina	2	2	1	1	-
Tiamina · HCl	0,5	0,5	0,25	0,25	0,5
Piridoxina · HCl	0,5	0,5	0,25	0,25	0,5
Ácido Nicotínico	5	5	2,5	2,5	5
Biotina	0,05	0,05	0,05	-	0,05
Ácido fólico	0,5	0,5	0,25	-	0,5
Aminoácidos					
Caseína hidrolisada	-	1000	-	-	-
L-fenilalanina	-	-	-	-	10
L-glutamina	2194	-	550	-	100
Fontes de Carbono					
Sacarose	20000	20000	20000	30000	20000

*Concentrações apresentadas em mg l⁻¹