

CRISLENE VIANA DA SILVA

ESTUDO MORFOANATÔMICO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS E SOMÁTICOS DE
JABUTICABA-BRANCA (*Myrciaria* sp.)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL

2005

CRISLENE VIANA DA SILVA

STUDO MORFOANATÔMICO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS E SOMÁTICOS DE
JABUTICABA-BRANCA (*Myrciaria* sp.)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de julho de 2005.

Prof^ª Marília Contin Ventrella
(Conselheira)

Prof. Wagner Campos Otoni

Prof. Luiz Carlos Chamhum Salomão

Pesq. Antônio de Pádua Alvarenga

Prof. Sérgio Yoshimitsu Motoike
(Orientador)

O mundo da cultura seria impensável se não fosse pelos atos de rebeldia daqueles que a construíram.

(Alves, 1986)

A Deus.

Aos meus pais Raimundo (*in memoriam*) e Lina.

Ao meu irmão Cristiano.

Ao André.

Aos meus amigos).

OFEREÇO E DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, maior responsável pelo êxito deste trabalho e a verdadeira essência da vida, por me conceber a oportunidade de viver buscando conhecer e acreditar na Sua imensa bondade, sobretudo estando sempre ao meu lado e guiando meus caminhos.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Fitotecnia, pela oportunidade de realização do Curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao meu orientador Professor Sérgio Yashimitsu Motoike, pela amizade, pela orientação profissional, pelos ensinamentos e pelo empenho e cumplicidade na realização deste projeto.

À Professora Marília Contim Ventrella, pela amizade, pelo aconselhamento e pela disposição em ensinar e sugerir valiosas sugestões e contribuições para o polimento deste trabalho.

Aos Professores Wagner Campos Otoni e Luiz Carlos Chamhum Salomão e ao Pesquisador da Epamig Antônio de Pádua Alvarenga, pela disponibilidade e pelas sugestões.

Ao Sr. Márcio e à Cenira, pela boa vontade em ajudar sempre e pelo carisma.

Ao bolsista de iniciação científica Edson, pela dedicação na execução dos experimentos.

À Secretária da Pós-Graduação, Mara, pela amizade e pela ajuda na resolução dos nossos problemas burocráticos.

Ao pessoal da Secretaria do Departamento de Fitotecnia Cássia, Marise, Graça, Dona Eva, Caetano, Vicente Madaleno e Luizinho, pelo apoio e auxílio.

Ao pessoal do Laboratório de Anatomia Vegetal, por compartilharmos momentos agradáveis, em especial à técnica Vânia, pela ajuda nas preparações dos reagentes; e à estudante Ana Lúcia Barros, pela amizade.

“Amizade compreende coisas que as palavras não podem expressar”... agradeço a amizade, as palavras de incentivo, os momentos alegres compartilhados e o carinho das minhas amigas e companheiras Viviane, Cíntia, Elen e Andréa.

À minha mãe Lina, sempre amável e querida, pela sua dignidade, por ter estado sempre ao meu lado e pelos ensinamentos e educação que me passou, sobretudo para eu ter esperança, fé e amor e acreditar na vida, fortalecendo-me no rumo a mais uma importante conquista profissional.

Ao meu irmão Cristiano, por estar sempre ao meu lado, com toda a sua alegria e constante apoio.

Ao André, pelo incentivo e pelas demonstrações de carinho, por ensinar-me a ser mais paciente e capaz.

A todos os meus colegas, em especial a Aurinete, Elisa, Neide, Flavia, Josi, Lylian, Myrian e Natália, pelo companheirismo, pela ajuda e pelas saudosas brincadeiras.

A todos os meus colegas com quem convivi no decorrer do Curso e a todos que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

BIOGRAFIA

CRISLENE VIANA DA SILVA, filha de Raimundo Rodrigues da Silva e Lina Joana Viana da Silva, nasceu em Ibitité, MG, em 26 de abril de 1979.

Em 2003, graduou-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

Nesse mesmo ano, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em julho de 2005.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Embriogênese somática.....	4
2.2. Fatores que afetam a embriogênese somática	8
2.3. Histologia e morfologia.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Coleta do material vegetal.....	15
3.2. Obtenção de embriões somáticos	15
3.3. Preparo das amostras para análise microscópicas	16
3.3.1. Microscopia fotônica.....	16
3.4.2. Microscopia eletrônica de varredura	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1. Estudo morfológico	18
4.2. Estudo anatômico e histoquímico	21
5 CONCLUSÕES.....	35
REFERÊNCIAS	36

RESUMO

SILVA, Crislene Viana da, M. S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2005.
Estudo morfoanatômico de embriões zigóticos e somáticos de jabuticababranca (*Myrciaria sp.*). Orientador: Sérgio Yoshimitsu Motoike. Conselheiros: Marília Contin Ventrella e Denise Fernandes Cunha dos Santos Dias.

O estudo detalhado do processo de formação dos embriões somáticos e sua comparação morfológica com embriões zigóticos pode fornecer informações relevantes para o aumento ou a manipulação da resposta embriogênica e uma melhor conversão dos embriões somáticos em plantas, uma vez que a análise comparativa da estrutura e morfologia dos embriões somático e zigótico podem apontar falhas do processo da embriogênese somática. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo o estudo morfoanatômico e histoquímico dos embriões somáticos e zigóticos de jabuticababranca, a fim de determinar as possíveis causas da baixa conversão em plântulas de embriões somáticos de jabuticabeiras. Foram coletados frutos maduros de jabuticababranca, sendo as sementes retiradas manualmente. Depois de retirada a mucilagem, parte das sementes foi utilizada para extração do embrião zigótico para o estudo morfoanatômico e histoquímico e parte para obtenção de embriões somáticos. Estes embriões foram obtidos “in vitro”, a partir de cotilédones de embriões zigóticos. Para o estudo anatômico e histoquímico, o material vegetal foi fixado em FAA_{50%} e estocado em etanol 70%. O material vegetal foi incluído em glicol-metacrilato e seccionado transversal e longitudinalmente, em micrótomo rotativo, com 6 µm de espessura. As

lâminas com os cortes foram submetidas ao azul-de-toluidina para metacromasia e ao reagente de lugol, para detecção de amido, e montadas em resina sintética. Os cortes foram analisados e fotografados em fotomicroscópio com sistema U-photo, câmera e microcomputador com o software Spot-Basic. Para a microscopia eletrônica de varredura, embriões somáticos foram fixados em glutaraldeído 3%, em tampão cocodilato de sódio 0,1 M a 4 °C, desidratados em série etanólica, seguida de secagem em ponto crítico de CO₂ líquido. As amostras foram preparadas nos suportes, cobertas com ouro, observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura. Análises histológicas apontaram desenvolvimento dos pró-embriões, os quais dão origem a embriões somáticos morfologicamente semelhantes a embriões zigóticos, porém os embriões zigóticos apresentam um procâmbio bem mais desenvolvido e grande quantidade de material de reserva e tamanho 10 vezes maior que os embriões somáticos. Nas análises histológicas dos embriões somáticos, observaram-se diversas anomalias, o que impediu a conversão desses embriões em plântulas. Além dessas anomalias, a falta de meristema apical e o procâmbio bem menos desenvolvido do que nos embriões zigóticos também colaboraram com a baixa conversão em plântulas. As análises histoquímicas dos embriões somáticos e zigóticos comprovaram que o material de reserva de ambos é o amido, porém, nos embriões somáticos, a quantidade de amido é menor e de ocorrência esporádica, sendo uma das causas da baixa conversão em plântulas. Através das análises histológicas, observou-se que os embriões somáticos passam pelos diferentes estádios de desenvolvimento globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar, à semelhança dos embriões zigóticos. Existem semelhanças na morfologia dos embriões somáticos e zigóticos, ambos com desenvolvimento de um par de cotilédones e eixo embrionário reduzido.

ABSTRACT

SILVA, Crislene Viana da, M. S., Univesrsidade Federal de Viçosa, July 2005.
Morphoanatomical study of zygotic and somatic embryos of white jaboticaba (Myrciaria sp.). Adviser: Sérgio Yoshimitsu Motoike. Committee Members: Marília Contin Ventrella and Denise Fernandes Cunha dos Santos Dias.

The detailed study of somatic embryo formation and its morphological comparison with zygotic embryos can elicit relevant information to the increase or manipulation of the embryogenic response and a better conversion of somatic embryos to plants, once the comparative analysis of the structure and morphology of the somatic and zygotic embryos can show defects in somatic embryogenesis. Therefore, the objective of the present work was the morphoanatomical and histochemical study of somatic and zygotic embryos of white-jaboticaba, in order to determine the possible causes of the low conversion of jaboticaba somatic embryos to plantlets. Ripe fruits were collected from white-jaboticaba trees, with seeds removed by hand. After removing the mucilage, part of the seeds was used for zygotic embryo extraction for morphoanatomical and histochemical studies, and part for obtaining somatic embryos. "*In vitro*" somatic embryos were obtained from cotyledons of zygotic embryos. The material was fixed in FAA50% and stored in 70% ethanol for anatomical and histochemical studies. The material was embedded in glycol methacrylate and 6 µm-thick sections were transverse and longitudinally cut using a rotating microtome. The sections collected on glass slides and stained in toluidine blue, and lugol for starch

detection, were mounted in synthetic resin. The sections were analyzed and photographed in a U-photo system light microscope, camera and microcomputer with the Spot-Basic software. For scanning electron microscopy, somatic embryos were fixed in 3% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer at 4 °C, dehydrated through a graded ethanol series, followed by liquid CO₂ critical point drying. The samples were mounted on the supports, coated with gold, observed and photographed in a scanning electronic microscope. The histological examination confirmed the development of pro-embryos, from which somatic embryos morphologically similar to zygotic embryos were produced, however the zygotic embryos presented a well developed procambium, a large amount of storage reserves and were tenfold larger than the somatic embryos. Histological analyses of somatic embryos showed several anomalies, which hindered the conversion of those embryos to plantlets. Besides the anomalies, the lack of apical meristem and the much less procambium developed than in the zygotic embryos also contribute to the low conversion to plantlets. The histochemical analyses of somatic and zygotic embryos proved that the storage reserves in both is starch, however, in somatic embryos, the amount of starch is smaller and of sporadic occurrence, being one of the causes of the low conversion to plantlets. Histological analyses showed that somatic embryos progress through different stages of development such as globular, heart shape, torpedo and cotyledonary, similar to zygotic embryos. The morphology of somatic and zygotic embryos is similar, both developing a pair of cotyledons and reduced embryonic axis.

1. INTRODUÇÃO

As jabuticabeiras (*Myrciaria* sp.) são espécies frutíferas da família Myrtaceae que têm o Brasil como centro de origem e de dispersão natural (PIO CORRÊA, 1984). Essas espécies foram domesticadas e incorporadas à cultura popular pelos indígenas Tupis (SEAGRI, 2001; MATTOS, 1983). Dessa planta, consomem-se os frutos *in natura* ou processados na forma de geléia, licor e vinho (LEÓN, 1987; GUIMARÃES, 1992; DONADIO, 1996). A jaboticaba também é utilizada na fabricação de extrato utilizado como corante de vinho e vinagre, substituindo flores de sabugueiro, malva e papoulas, que são importadas (JABOTICABA, 1986).

As jabuticabeiras podem ser plantadas na maior parte do território nacional, sendo, no entanto, mais cultivadas nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná e Goiás (OLIVEIRA, 2002). Dentre as espécies mais conhecidas e apreciadas no Brasil estão a *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg., popularmente denominada jaboticaba-sabará; e *Myrciaria cauliflora* (Mart.) Berg., conhecida como jaboticaba-açu ou paulista (MENDONÇA, 2000).

O gênero *Myrciaria* é, entretanto, composto por pelo menos nove espécies, das quais *M. oblongata* Mattos, conhecida popularmente como jaboticaba-azedada, já é considerada extinta (MATTOS, 1983). No mesmo caminho da *M. oblongata*, muitas outras espécies de jabuticabeiras nativas do Brasil, incluindo *M. espirito-santenses* Mattos, *M. grandifolia* Mattos (jaboticaba-graúda) e *M. aureana* Mattos (jaboticaba-branca), estão ameaçadas de extinção (MATTOS, 1983; DONADIO, 2000). Na maioria

dos casos, exemplares dessas espécies são somente encontrados em coleções institucionais, não mais existindo na natureza (MATTOS, 1983).

A Universidade Federal de Viçosa (UFV) mantém em seu Setor de Fruticultura uma coleção com diversas espécies de jabuticabeiras, algumas delas ainda sem identificação botânica. Essa coleção vem sendo constituída há mais de 40 anos, por meio de introduções de material propagativo diretamente de seu “habitat”, ou coletadas em propriedades da zona rural das diversas regiões do Brasil. Juntas, essas plantas compõem uma das mais preciosas coleções de jabuticabeiras do Brasil, constituindo-se em fonte estratégica de material genético para o melhoramento da planta para a exploração comercial e, também, para a reposição das espécies em extinção na natureza.

A manutenção de um banco de germoplasma de plantas como a jabuticabeira no campo apresenta, contudo, vários problemas, incluindo o alto custo de manutenção, exposição das plantas a desastres naturais e ataques de pragas e doenças. O exemplo disso é a perda de vários exemplares da coleção da UFV nesses últimos cinco anos, em razão da falta de recursos para manutenção das áreas de campo. Segundo Donadio (2000), outras coleções importantes de jabuticabeiras, como a do Instituto de Botânica de São Paulo, da Estação Experimental de Osório, em Maquine (RS), do Instituto Agrônomo de Campinas (SP) e da ESALQ/USP de Piracicaba (SP), encontram-se atualmente também em mau estado de conservação, colocando em risco de extinção muitas das espécies de jabuticabeiras que fizeram parte da flora nativa brasileira.

Considerando que o armazenamento de sementes desta espécie é dificultado em razão do seu caráter recalcitrante (CHANDEL et al., 1995; MENDONÇA, 2000), torna-se imprescindível o desenvolvimento de técnicas seguras e eficazes para a manutenção dessas espécies em bancos de germoplasma.

A criopreservação é uma técnica que tem sido empregada por agências como Kings Park e Botanic Garden na Austrália e Royal Botanic Gardens no Reino Unido, para conservar germoplasmas de espécies de sementes recalcitrantes (ROYAL BOTANIC GARDENS KEW, 2001; TURNER et al., 2001). A técnica da criopreservação consiste no armazenamento do material vivo a temperaturas próximas à do nitrogênio líquido (-196 °C). A essa temperatura, o metabolismo celular é eficientemente paralisado, e o material pode ser conservado em estado de suspensão metabólica, em condições livres de riscos de contaminação por patógenos e, ou, de variações genéticas, por longo período de tempo (BAJAJ, 1995). As vantagens da criopreservação sobre outros métodos convencionais de preservação de germoplasma

são: diminuição nos custos associados à manutenção com coleções vivas, redução no espaço de armazenamento do material, minimização das perdas causadas por doenças e contaminações e minimização das variações somaclonais (BAJAJ, 1995; TURNER et al., 2001). Entretanto, a aplicação dessa técnica de conservação depende do domínio dos processos da morfogênese *in vitro*. No entanto, informações sobre a morfogênese *in vitro* de jabuticabeiras são escassas ou inexistentes, dificultando os estudos de criopreservação dessas espécies.

Entre os raros trabalhos enfocando morfogênese *in vitro* em jabuticabeiras está o trabalho apresentado por Saraiva et al. (2004). Neste trabalho, esses autores relataram a obtenção de embriogênese somática em *Myrciaria* sp. e a produção de massa pró-embriogênica de alta capacidade de regeneração. No entanto, estudos recentes têm apontado que embriões somáticos de jabuticaba, obtidos a partir do protocolo de Saraiva et al. (2004), apresentaram baixos índices de conversão em plântulas, requerendo aperfeiçoamento do processo.

O estudo detalhado do processo de formação dos embriões somáticos e sua comparação com embriões zigóticos podem fornecer informações relevantes para o aumento ou manipulação da resposta embriogênica, bem como ainda uma melhor conversão dos embriões somáticos em plantas, uma vez que a análise comparativa da estrutura e morfologia dos embriões somático e zigótico pode apontar falhas no processo da embriogênese somática.

O presente trabalho teve como objetivo os estudos morfológico, anatômico e histoquímico dos embriões somáticos e zigóticos de *Myrciaria* sp., a fim de determinar as possíveis causas da baixa conversão em plântulas de embriões somáticos de jabuticabas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Embriogênese somática

Embriogênese somática é o processo pelo qual células somáticas se desenvolvem através dos diferentes estágios embriogênicos, dando origem a uma planta sem a ocorrência da fusão de gametas. O desenvolvimento do embrião somático tem semelhança com o desenvolvimento do embrião zigótico (RAGHAVAN, 1976), e existe interesse no conhecimento dos mecanismos moleculares que estão associados com a formação dos embriões somáticos e zigóticos (DODEMAN et al., 1997).

A morfogênese é caracterizada pela diferenciação de uma estrutura bipolar, constituída de ápices caulinar e radicular. Os estágios de desenvolvimento pró-embriônários e embriônários globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar acontecem em ambos os casos. Nos embriões somáticos globular e cordiforme, as estruturas internas são semelhantes às dos equivalentes zigóticos. Há evidência de protoderme no estágio cordiforme além da protoderme, assim como a polaridade e a simetria bilateral (SMITH, 1985).

A embriogênese somática tem demonstrado ser o melhor método de multiplicação em grande escala. Trata-se de um processo característico das plantas vasculares, pelo qual células ou tecidos somáticos se desenvolvem até a formação completa de uma planta, através de uma série de estágios embriogênicos semelhantes àqueles observados na formação de embriões zigóticos (WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986; RODRIGUEZ et al., 2000).

Na cultura de tecidos, a embriogênese somática foi descrita em diversas espécies, incluindo angiospermas e gimnospermas, normalmente resultando em agrupamento de células pró-embriogênicas, as quais, posteriormente, regeneraram embriões somáticos correlacionados com alterações nas condições hormonal e nutricional do meio de cultura (HALPERIN, 1995).

A embriogênese somática é uma ferramenta da biotecnologia na propagação clonal de genótipos-elite através da tecnologia de semente sintética (GRAY; PUROHIT, 1991; REDENBAUGH, 1993). E torna-se vantajoso combinar a eficiência e o baixo custo das sementes sintéticas como fonte de propágulos para produção clonal massal *in vitro* de embriões a partir de células somáticas (GUERRA et al., 1999).

A sobrevivência e crescimento das plantas regeneradas dependem das condições providas nas fases iniciais, quando os embriões são formados, amadurecem e germinam. Contudo, para se obter a propagação em massa de plantas por meio da embriogênese somática, é importante que se conheçam os fatores críticos que ocorrem durante o processo na obtenção de plântulas normais.

De maneira geral, o processo de embriogênese somática pode ser dividido em três fases distintas, como indução, maturação e germinação (AMMIRATO, 1987; RANGH; PAGE, 1988). Nas espécies estudadas até o momento, tem-se observado uma grande semelhança, do ponto de vista morfológico, entre a embriogênese somática e a zigótica, especialmente após as primeiras divisões celulares do embrião (WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986). Os estádios iniciais da embriogênese são considerados como processo crítico, pois são estabelecidos a polaridade, a camada de células protodérmicas e os demais meristemas (BOZHKOV et al., 2002).

Os marcadores qualitativos do desenvolvimento *in vitro* permitem uma comparação entre as embriogêneses zigótica e somática (GUERRA et al., 1999). Apesar de esses embriões se desenvolverem através de estádios similares aos do embrião zigótico, não entram em dormência, não possuem endosperma e tecido suspensor e nem formam tegumento, ficando livres de correlações físicas, fisiológicas e genéticas que ocorrem durante o desenvolvimento do embrião zigótico (ZIMMERMANN, 1993). Também apresentam sistema vascular fechado, sem conexão vascular com os tecidos do explante inicial (DODEMAN et al., 1997).

Existem dois padrões básicos de expressão da embriogênese somática *in vitro*, o direto e o indireto (SHARP et al., 1980). Na embriogênese direta, os embriões somáticos originam-se dos explantes sem a formação de estádios intermediários de calo.

Na embriogênese indireta, os embriões somáticos se formam a partir de um calo, que apresenta células em diferentes estádios de diferenciação e, conseqüentemente, com diferentes graus de determinação, as quais podem adquirir novas competências mediadas por mensageiros químicos específicos (SHARP et al., 1980).

Em plantas de soja, houve tanto a ocorrência de embriogênese direta quanto, em menor freqüência, a indireta (BARWALE et al., 1986). Provavelmente, a ocorrência via indireta se estabelece em culturas embriogênicas de células em suspensão, a partir de calos induzidos em meio sólido (BEVERSDORF; BINGHAM, 1977; GAMBORG et al., 1983; CHRISTIANSON et al., 1983; LI et al., 1985; KERNS et al., 1986).

Independentemente de ser embriogênese direta ou indireta, para a formação de embriões somáticos são necessárias altas concentrações de reguladores de crescimento. Assim, o balanço hormonal é um fator de grande importância no controle do desenvolvimento do embrião (TISSERAT et al., 1979; SHARP et al., 1980; VASIL, 1982).

Na embriogênese somática, a compreensão dos estímulos e condições necessárias para a indução e controle desses processos é ainda limitada. Segundo Guerra et al. (1998), a possibilidade de manipulação desse sistema para fins tecnológicos depende do domínio preciso da fisiologia do desenvolvimento e aspectos relacionados à morfogênese (integração entre os processos decorrentes de divisão e diferenciação celular), incluindo processos de determinação celular (processo pelo qual o potencial de desenvolvimento de uma célula se torna limitado a uma rota específica); competência celular (capacidade das células reagirem a sinais específicos de desenvolvimento reguladores de crescimento) e epigênese (ativação seletiva e diferencial de genes, envolvendo células receptivas ou tecidos responsivos).

Dados da literatura indicam que a competência embriogênica está associada a sinalizações de receptores que são segregados assimetricamente durante a divisão celular. A sinalização entre células com diferentes funções também é requerida para a iniciação da embriogênese somática; não se conhece a necessidade de um requerimento similar para obtenção de embriões zigóticos (HARADA, 1999).

Em geral, as auxinas, entre elas o 2-4-D, são consideradas as substâncias responsáveis por desencadear os processos de desdiferenciação (modelos indiretos) e rediferenciação (modelos diretos), alterando a determinação e conferindo novas competências às células responsivas presentes nos explantes. Os hormônios exercem sua função por meio do reconhecimento de receptores específicos, presentes nessas

células, traduzindo sinais hormonais em eventos bioquímicos e fisiológicos (HARADA, 1999).

A resposta a determinado hormônio pode ser alterada por mudanças no número e afinidade dos receptores e no nível de outras substâncias endógenas (FIRN, 1986). Esse conjunto de aspectos analisados explica por que determinados explantes são competentes para a embriogênese somática e outros não e também por que explantes de mesma origem coletados em diferentes períodos apresentam respostas distintas à indução embriogênica (GUERRA et al., 1998). Assim, o “estado fisiológico do embrião” seria a condição na qual as células responsivas do explante conteriam grande número de receptores para aqueles reguladores de crescimento presentes no meio da cultura. Então, a embriogênese somática é o resultado da ativação de células responsivas contendo receptores para determinado regulador de crescimento. Essas células seriam rediferenciadas para novas rotas morfogênicas, gerando células-mães embrionárias competentes, que podem originar populações clonais de células embriogênicas (GUERRA et al., 1998).

De maneira geral, a embriogênese somática é induzida por auxinas, e, assim, uma célula somática adquire competência para originar uma linhagem de células-filhas que irão formar embriões somáticos. Entre os fatores que podem afetar esse processo estão: explante, pH, composição do meio nutritivo, reguladores de crescimento, concentração osmótica e luz (TOONEN et al., 1996).

A embriogênese somática foi demonstrada em grande número de angiospermas, inclusive em várias espécies lenhosas (TULECKE, 1987). Porém, na família Myrtaceae, esse tipo de morfogênese foi obtido em algumas espécies, como *Eucalyptus citriodora* (MURALIDHARAM et al., 1989), *Eucalyptus grandis* (WATT et al., 1991), *Eugenia jambos* (LITZ, 1984a), *Eugenia malaccensis* (LITZ, 1984a), *Myrciaria cauliflora* (LITZ, 1984b) e *Myrtus communis* (PARRA; AMO-MARCO, 1998). Em *Feijoa sellowiana* (CANHOTO; CRUZ, 1996), os embriões somáticos surgem, principalmente, em cotilédones de embriões zigóticos em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) contendo 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D (4-5 µM ácido 2,4- diclorofenoxiacético) e 0,3 M de sacarose, obtendo formação de embriões somáticos no explante embriogênico.

A cultura embriogênica é iniciada a partir do explante cultivado em meio contendo um regulador de crescimento. Na embriogênese direta, a primeira expressão morfogênica é o surgimento de estruturas globulares brancas e translúcidas que correspondem a embriões somáticos globulares.

Para a manutenção, multiplicação e cultura massal, a estratégia consiste em determinar as condições adequadas para o estabelecimento de ciclos repetitivos de divisão celular e o controle restrito dos processos de diferenciação, de maneira que as culturas sejam constituídas por células pró-embriônicas ou embriões somáticos em estágios globulares iniciais (GUERRA et al., 1998).

A estimulação da progressão das fases iniciais para as fases tardias é uma estratégia que consiste em interromper os ciclos repetitivos de divisão celular e fornecer os estímulos fisiológicos, bioquímicos e ambientais para a diferenciação celular, para que os ciclos de desenvolvimento e de maturação originem grande número de embriões somáticos maduros, de alta qualidade e aptos para a conversão em plantas (GUERRA et al., 1998).

2.2. Fatores que afetam a embriogênese somática

A indução da embriogênese somática está relacionada com alterações no padrão de expressão gênica nos explantes e reprogramação das células que estarão envolvidas no processo embriogênico (MERKLE et al., 1995). De acordo com as características morfológicas, anatômicas e funcionais das estruturas embriogênicas que se formam, poderá ou não ocorrer diferenciação em embriões somáticos.

Vários fatores estão relacionados à indução do estágio embriogênico, como característica dos explantes, tipo e doses de aplicação de reguladores vegetais, genótipo, espécie, componentes do meio como cálcio, fonte de nitrogênio, açúcar e condições ambientais (MERKLE et al., 1995).

Na cultura de tecidos é importante o meio de cultivo utilizado, de acordo com a fase da morfogênese e da exigência da espécie. O meio MS, no caso da soja (*Glycine max*), é mais usado para indução e conversão de embriões somáticos, enquanto o meio FN (FINER e NAGASAWA, 1988) é utilizado para proliferação da cultura embriogênica (SAMOYLOV et al., 1998). Em *Feijoa sellowiana* Berg, a indução da embriogênese somática foi também obtida com meio MS (GUERRA et al., 2001), que foi inicialmente testado para o crescimento de calos em *Nicotiniana* spp. (MURASHIGE; SKOOG, 1962). A embriogênese somática a partir de flores de *Vitis x labruscana* foi obtida com meio NN (NITSCH; NITSCH, 1969) suplementado com 17 µM ácido indol-3-pírico (IASP) e 9 µM 2,4-ácido diclorofenoxi-acético (MOTOIKE et al., 2001). O meio MS é muito utilizado em cultivo “in vitro” de plantas, pela elevada

concentração de nitrogênio na forma de amônio e maiores concentrações de fósforo e potássio, diferenciando-se dos demais meios de cultura.

O nitrogênio suplementado no meio durante o processo embriogênico é de grande importância, por ser um nutriente indispensável para formação de proteínas, ácidos nucleicos e síntese de substâncias de reserva (MERKLE et al., 1995). Em sementes, o embrião imaturo não possui a enzima nitrato redutase, que reduz nitrato (NO_3^-) a nitrito e, em seguida, a amônio (NH_4^+). Portanto, a utilização de nitrogênio reduzido no cultivo do embrião somático torna-se algo indispensável (MONNIER, 1995).

A quantidade de nitrogênio total e a relação NO_3^- : NH_4^+ podem variar conforme as condições de cultivo e a espécie estudada. O nitrogênio na forma de nitrato, em condições de cultivo *in vitro*, pode ser suficiente no desenvolvimento dos embriões, os quais podem adquirir nitrogênio reduzido, freqüentemente liberado por células em cultivo, tornando o amônio indispensável na iniciação da embriogênese somática (NOMURA; KOMAMINE, 1995).

As auxinas têm efeitos dependentes da quantidade de nitrogênio adicionado, havendo interação entre esses dois componentes do meio de cultura (MOHAN RAM et al., 1982). O modo de ação das auxinas não é totalmente conhecido no processo embriogênico, mas é um dos produtos mais utilizados na indução de embriogênese somática em diversas espécies (MERKLE et al., 1995). A auxina 2,4-D é a mais utilizada para promover a formação de células embriogênicas em diversas espécies.

O embrião somático pode apresentar desenvolvimento anormal. Alguns embriões somáticos produzem meristemas sem função, impedindo o seu desenvolvimento futuro. Em muitos embriões somáticos, os meristemas apicais se encontram parcialmente organizados ou não existem. Também podem apresentar algumas anomalias no seu padrão vascular (DODEMAN et al., 1997). Alterações na formação de seus meristemas podem levar à perda da capacidade de germinação (DODEMAN et al., 1997).

A exposição do explante à auxina é essencial na indução do estágio embriogênico, entretanto é prejudicial ao processo de histodiferenciação, podendo interferir no desenvolvimento do embrião somático. Halperin e Wetherell (1964) observaram que a continuação do 2,4-D no meio de cultura em embriões somáticos de cenoura, no estágio globular, inibiu a histodiferenciação ou conduziu ao desenvolvimento anormal do meristema apical. Em soja (*Glycine max*), o

desenvolvimento de embriões somáticos foi inversamente proporcional ao tempo de exposição à auxina (PARROTT et al., 1988). Stuart et al. (1988) observaram a importância da remoção do regulador de crescimento no meio de indução, que inibe a expressão de proteínas de reserva. O elevado nível de auxina durante a indução levou ao acúmulo dessa substância, podendo ter ocorrido supressão da expressão de genes relacionados à síntese de proteínas de reserva e, conseqüentemente, o seu acúmulo. A auxina exógena também pode levar ao desenvolvimento anormal ou à supressão do eixo embrionário (MERKLE et al., 1995).

A maturação adequada do embrião somático permite uma melhor germinação do embrião, aumentando a eficiência da conversão de plântulas. Após a divisão celular e histodiferenciação, o período de desenvolvimento do embrião em que ocorre expansão das células, desidratação e acúmulo de substâncias de reserva é considerado a fase de maturação (BEWLEY; BLACK, 1985).

Slawinska e Obendorf (1991) desenvolveram protocolos que foram eficientes no processo de maturação dos embriões somáticos de soja, em que obtiveram um estágio quiescente sem ocorrer germinação precoce. Essa germinação precoce é caracterizada pelo alongamento prematuro de células do hipocótilo e do ápice caulinar, durante o alongamento da radícula (MONNIER, 1995). Se a germinação precoce for inibida e o processo de maturação prolongado, pode-se obter sincronismo no desenvolvimento do embrião somático, revertendo em maior porcentual de conversão em plântulas normais.

Diversos autores têm utilizado ácido abscísico (ABA), polietilenoglicol (PEG) e sacarose na dessecação de embriões somáticos e na prevenção da germinação precoce, principalmente em espécies florestais (ROBERTS et al., 1990; MISRA et al., 1993; CAPUANA; DEBERGH, 1997; LI et al., 1998).

Em coníferas, o efeito do estresse hídrico provocado por PEG, quando associado ao ABA no meio de maturação, leva à produção de embriões somáticos semelhantes ao embrião zigótico, em termos de conteúdo de água (umidade), alto grau de quiescência e habilidade de sobreviver à dessecação (ATTREE et al., 1991).

Li et al. (1998), estudando o efeito da maturação em embriões somáticos de *Pinus taeda* L., observaram um efeito superior de PEG em relação à maltose. O PEG, com peso molecular acima de 3000, não provocou plasmólise nas células, apesar do potencial osmótico elevado (ATTREE; FOWKE, 1993).

Misra et al. (1993), através da combinação de PEG e ABA na maturação de embriões somáticos de *Picea glauca* Moench Voss, avaliaram uma gama de

polipeptídeos semelhantes aos encontrados nos embriões zigóticos maduros. No entanto, na maturação do embrião somático em meio contendo baixo potencial osmótico e ABA observou-se ausência de algumas formações de cristalóides e matrizes polipeptídicas. Capuana e Debergh (1997) obtiveram resultados semelhantes, indicando que o melhor meio de maturação foi alcançado através do meio enriquecido com ABA e PEG.

De acordo com Xu et al. (1990), o estresse osmótico pode prevenir a germinação precoce no desenvolvimento do embrião somático de alfafa (*Medicago sativa* L.). E o elevado potencial osmótico é requerido para o desenvolvimento de embriões a partir de pólen de canola (DUNWELL; THURLING, 1985) e na maturação de embrião somático de soja (BUCHHEIM et al., 1989; SLAWINSKA; OBENDORF, 1991).

Depois da fase de desenvolvimento do embrião zigótico, ocorrem o período de dormência e, conjuntamente a essa fase, a desidratação. Durante o período de maturação há acúmulo de reservas e endurecimento dos tegumentos, originando, assim, a semente (MONNIER, 1995). Para a germinação e o desenvolvimento do embrião em nível autotrófico, é necessário que ocorra o acúmulo de reservas (MERKLE et al., 1995).

Segundo Monnier (1995), a fase de proliferação e crescimento do embrião marca o início da síntese e acúmulo de proteína, conduzindo ao incremento do vigor e peso de matéria seca do embrião. As análises de acúmulo de reserva no desenvolvimento dos embriões somáticos podem revelar semelhanças ou diferenças notáveis quando comparadas com embriões zigóticos. Essas diferenças e os casos anormais de expressão de proteínas de reservas em embriões somáticos podem ser atribuídos às condições de cultivo utilizadas durante a fase de maturação “in vitro”. Manipulando as condições de cultivo para prolongar a maturação do embrião e prevenir a germinação precoce, pode-se favorecer a similaridade entre embriões zigóticos e somáticos (MERKLE et al., 1995).

2.3. Histologia e Morfologia

No processo de regeneração *in vitro*, as análises histológicas e morfológicas do material vegetal, utilizando técnicas de microscopias fotônica e eletrônica, podem ser fundamentais para a interpretação dos resultados.

As análises histológicas podem ser utilizadas para caracterizar as alterações celulares, identificar e caracterizar a formação de estruturas monopolares ou bipolares,

analisando a qualidade e desenvolvimento dessas estruturas. Juntamente com análises morfológicas do material vegetal, pode-se caracterizar a via de regeneração, permitindo compreender melhor a morfogênese *in vitro*, visando à otimização dos protocolos de obtenção de plântulas em cultura de tecidos.

A regeneração *in vitro* consiste, basicamente, de três fases: desdiferenciação, em que o tecido adquire competência para responder ao processo morfogênico; indução, quando as células se tornam determinadas a desenvolver estrutura monopolar (ápice radicular ou ápice caulinar) ou bipolar (embrião); e desenvolvimento, com crescimento de órgãos ou embrião (De KLERK et al., 1997).

Na fase de indução, as análises histológicas permitem caracterizar as alterações celulares. As células embriogênicas caracterizam-se por serem pequenas, com citoplasma denso, nucléolo grande, pouca vacuolização e pequenos grânulos de amido (MICHAUX-FERRIÈRE; SCHWENDIMAN, 1992). O desenvolvimento dessas células não é sincronizado, variando conforme as condições do meio de cultura, sendo capazes de se dividirem ou se envolverem na formação de embriões. As células que não formam pró-embriões começam o processo de diferenciação, ou seja, a vacuolização, diminuição em volume do nucléolo e o acúmulo ou o desaparecimento de grânulos de amido (MICHAUX-FERRIÈRE; SCHWENDIMAN, 1992).

A adequação do meio de cultura torna-se essencial para a expressão do potencial embriogênico dessas células. Os embriões somáticos podem iniciar-se em diferentes tempos durante o desenvolvimento dos calos, variando de poucas semanas a vários meses de cultura (MICHAUX-FERRIÈRE; SCHWENDIMAN, 1992). Michaux-Ferrière e Carron (1989), através de análises histológicas, estudaram o efeito da permanência do calo no meio de cultura e o seu tempo de subcultivo em *Hevea brasilienses*. Observaram que cerca de 20 a 60% dos calos convergiram-se em embriões, ressaltando-se que, desses, poucos eram totalmente formados. Os embriões apresentavam ausência de individualização do meristema caulinar, devido ao desenvolvimento desigual dos cotilédones e à ocorrência de embriões fusionados.

Através de análises histológicas, Goh et al. (1999) observaram que células vasculares de raízes de *Calamus manan*, cultivadas em meio com $7,5 \text{ mgL}^{-1}$ de picloram (ácido-4-amino-3,5,6-tricloropicolínico), originaram calos embriogênicos, com características de células morfogênicas, com núcleo volumoso, intensa divisão celular e alta razão núcleo/citoplasma.

Em diversas culturas, verifica-se que grande número de células embriogênicas é iniciado durante o processo de embriogênese somática, mas nem todas têm habilidade de se converterem em pró-embriões. Conseqüentemente, o número de embriões bipolares formados é relativamente menor quando comparado com o número de pró-embriões globulares ou de células embriogênicas. Essa baixa capacidade de conversão do embrião somático em plântula não se restringe apenas às condições inadequadas do meio de cultura, mas se refere à ontogênese anormal ou imatura do embrião somático, quando comparado com embrião zigótico (MICHAUX-FERRIÈRE; SCHWENDIMAN, 1992). Assim, as análises histológicas e morfológicas também podem contribuir para os estudos da ontogênese dos embriões somáticos, identificando as possíveis falhas no seu desenvolvimento, além da comparação com embriões zigóticos.

Diversas anormalidades de embriões somáticos, como falha estrutural ou funcional do meristema caulinar (NICKLE; YEUNG, 1993), conversão prematura (germinação) do embrião (AMMIRATO, 1985), cotilédones aberrantes (FUJII et al., 1990) e desintegração do meristema caulinar (YEUNG et al., 1996) foram encontrados em protocolos de embriogênese somática.

Alemanno et al. (1997) observaram anormalidades nos embriões somáticos de *Theobroma cacao*. Nas análises histológicas, também verificaram embriões somáticos pobres em amido e proteínas de reserva, além de apresentarem alto conteúdo de água em comparação com os embriões zigóticos.

Análises histológicas e morfológicas no embrião somático de *Ipomoea batatas* identificaram cinco tipos de variantes, sendo a formação do meristema caulinar menos freqüente do que a formação do meristema radicular, conduzindo-o à baixa conversão em plântula (PADMANABHAN et al., 1998). Nesse caso, as anormalidades observadas foram associadas, principalmente, com a falta de organização do meristema apical caulinar.

As análises histológicas e morfológicas de embriogênese somática em cultivares de *Musa* spp. revelaram alguns aspectos dos embriões somáticos, como melhor formação do ápice radicular, porém formação deficiente do ápice caulinar (CRONAUER; KRIKORIAN, 1983; BANERJEE et al., 1987; LEE et al., 1997), e embriões somáticos normais com desenvolvimento bipolar (ápice caulinar e radicular) (MARROQUIN et al., 1993; ESCALANT et al., 1994; CÔTE et al., 1996), e vários estágios de desenvolvimento dos embriões somáticos (ESCALANT et al., 1994; LEE et al., 1997; NAVARRO et al., 1997).

Essas análises de microscopia fotônica e eletrônica do material vegetal *in vitro* de *Myrciaria* sp. tornaram-se necessárias, pois permitem detectar possíveis anormalidades no processo de obtenção da embriogênese somática, bem como confirmar a via de regeneração.

A embriogênese somática é um método importante na propagação de plantas-elite *in vitro*. Também é uma estratégia que permite que estádios iniciais embrionários sejam manipulados experimentalmente, de forma a realizar estudos básicos relacionados com a fisiologia do desenvolvimento do embrião (YEUNG, 1995). Atualmente, vem sendo utilizada com sucesso para produção de plantas transgênicas (PRAKASH; VARADARAJAN, 1992; GAMA, 1993) e sementes sintéticas (SCHUTHEIS et al., 1990). É uma técnica extremamente vantajosa para obtenção de plantas geneticamente transformadas, devido à grande quantidade de material que pode ser produzido de um único explante.

Testes preliminares e protocolo de indução da embriogênese somática de *Myrciaria* sp. utilizado neste trabalho foram definidos por Santana et al. (2004) no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais no Setor de Fruticultura do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa. Porém, Santana et al. (2004) não definiram os caminhos para a progressão das diversas fases da embriogênese somática nessa espécie, tornando-se imprescindível à definição desses protocolos para a utilização desse material em pesquisas, tal como na criopreservação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais do Setor de Fruticultura do Departamento de Fitotecnia e no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV). O trabalho consistiu de um estudo morfológico, anatômico e histoquímico de embriões somáticos e zigóticos de jabuticaba-branca.

Os embriões zigóticos utilizados neste estudo foram obtidos de sementes de jabuticaba-branca, as quais foram colhidas de plantas da coleção de jabuticabeiras do Departamento de Fitotecnia da UFV.

3.1. Coleta do material vegetal

Foram coletados frutos maduros, sendo as sementes retiradas manualmente dos frutos. As sementes foram lavadas em água corrente e esfregadas com cal para retirada da mucilagem. A seguir, parte das sementes foi utilizada para a extração dos embriões zigóticos e parte para obtenção de embriões somáticos.

3.2. Obtenção de embriões somáticos

Os embriões somáticos foram obtidos *in vitro*, a partir de cotilédones de embriões zigóticos, conforme descrito por Saraiva et al. (2004).

Logo após a retirada da mucilagem, as sementes foram submetidas à desinfestação, que consiste na imersão por 15 minutos em Captan 2,5 g L⁻¹, seguida de imersão por 1 minuto em etanol 70% e 30 minutos em solução de hipoclorito de sódio (2 a 2,5% de cloro ativo) e 0,01% Tween 20.

Após esse processo, os cotilédones foram lavados em água deionizada estéril por três vezes, abertos e inoculados em placas de Petri (90 x 15 mm), contendo 30 mL de meio de cultura. Esse meio foi constituído dos sais de NN (NITSCH; NITSCH, 1969), 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mioinositol, 800 mg L⁻¹ de polivinilpirrolidone, vitamina Staba (STABA, 1969) e 20 µM de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). O pH do meio foi ajustado a 5,7±1 e geleificado com 7,5 g L⁻¹ de ágar (Bacto).

Os explantes foram mantidos nesse meio por 50 dias, em ausência de luz e na temperatura controlada a 25 °C ± 1 °C. Após esse período, foram transferidos para um segundo meio de cultura, constituído pelos mesmos sais e componentes orgânicos, porém com 30 µM de 2,4-D e 17 µM de ácido indol-3-aspártico (IASP). Após 17 dias de incubação nesse meio, em condições descritas anteriormente obtiveram embriões somáticos, os quais foram induzidos à maturação em meio NN (NITSCH; NITSCH, 1972), sem adição de fitorreguladores e com acréscimo de 50 g L⁻¹ de polietilenoglicol (PEG 4000), mantidos em sala de cultura com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas sem luz, com 75 de irradiância.

3.3. Preparo das amostras para análises microscópicas

3.3.1. Microscopia fotônica

Para os estudos anatômicos e histoquímicos, o material vegetal foi coletado aos 20 dias de cultivo, obtido do primeiro meio de cultivo, citado anteriormente, e aos 60 dias de cultivo, obtido do segundo meio de cultivo. Coletaram-se 10 explantes de embriões somáticos em cada cinco placas de Petri para cada meio de cultivo, sendo fixados em solução de FAA_{50%} e estocados em etanol 70% (JOHANSEN, 1940).

Para elaboração de laminário permanente, o material foi incluído em glicol-metacrilato (Historesin-Leica), de acordo com as recomendações do fabricante e de Carmello-Guerreiro (1995), e seccionados transversal e longitudinalmente, em micrótomo rotativo, com 6 µm de espessura.

As lâminas com os cortes foram submetidas a diferentes corantes/reagentes e montadas em resina sintética (Permount). As lâminas foram coradas com azul-de-toluidina para metacromasia, PAS (ácido periódico/reagente de Schiff) para carboidratos neutros, XP (xylydine Ponceau) para proteínas totais e Lugol para detecção de amido.

O laminário foi analisado em microscópio de luz, com o registro fotográfico e as imagens digitalizadas, correspondentes às seções transversais e longitudinais de diferentes porções do explante e dos embriões somáticos, obtidos por meio de um fotomicroscópio (Olympus AX70) com sistema U-photo, câmera e microcomputador com o software Spot-Basic.

3.3.2. Microscopia eletrônica de varredura

As amostras foram obtidas de 10 explantes de embriões somáticos em cada cinco placas de Petri, e para cada meio de cultivo foram fixadas em glutaraldeído 3% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M a 4 °C, por 48 horas, com 2 horas sob vácuo. Logo após, as amostras foram lavadas três vezes em tampão cacodilato de sódio (0,1 M) por 10 minutos cada troca e desidratadas em série etanólica, seguidas de secagem em ponto crítico de CO₂ líquido (RODRIGUEZ; WETZSTEIN, 1998). As amostras secas foram preparadas nos suportes, cobertas com ouro, observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura (LEO 1430 VP, Inglaterra).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudo Morfológico

Na fase de maturação dos embriões somáticos de jabuticaba-branca, a massa pró-embriogênica vai se desenvolvendo, dando origem a vários embriões em diferentes estádios de maturação (Figura 1A), como massa pró-embriogênica com formação de calo, embrião globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar. Esses embriões são facilmente destacados do calo. Em *Eucalyptus nidens* (BANDYOPADHYAY; HAMILL, 2000) e *Eucalyptus citriodora* (MURALIDHARAN; MASCARENHAS, 1987), esses autores observaram também que os embriões somáticos se destacam facilmente dos calos; são importantes para um procedimento efetivo automatizado e na encapsulação dos embriões somáticos (GARRETT, 1993). Porém, antes da aplicação dessa tecnologia, é necessário entender o processo de origem dos embriões somáticos.

Os embriões somáticos cotiledonares são pequenos, constituídos, basicamente, por um par de cotilédones, enquanto os embriões zigóticos possuem também um par de cotilédones, porém seu tamanho é bem superior (Figura 1B). Contudo, essa diferença de tamanho dos cotilédones de ambos os embriões é maior nos cotilédones dos embriões zigóticos, em comparação com os cotilédones dos embriões somáticos, inferindo que os embriões zigóticos possuem muito mais material de reserva a ser usado no fornecimento de energia para a conversão em plantas, enquanto os embriões somáticos têm bem menos material de reserva, e este ocorre esporadicamente, afetando, assim, sua conversão em plantas. A existência de material de reserva, como grãos de amido nos

embriões somáticos, pode ser importante para produção de sementes sintéticas, fornecendo energia metabólica para multiplicação das células embriogênicas.

Pode-se observar que os cotilédones dos embriões zigóticos possuem formato elíptico a reniforme e são estruturas macroscópicas, porém o eixo hipocótilo-radícula é bastante reduzido em relação ao tamanho dos cotilédones (Figura 1C). Essa observação também serve para os embriões somáticos com eixo reduzido em relação ao tamanho dos cotilédones. A morfologia, juntamente com a análise histológica, indica que os embriões somáticos têm semelhanças fortes com embriões zigóticos obtidos de sementes maduras.

Os embriões somáticos, semelhantemente aos zigóticos, também desenvolvem uma estrutura bipolar com ápices caulinar e radicular (Figura 1E). A formação completa dos embriões somáticos de jabuticaba-branca ocorreu esporadicamente, impedindo o estudo comparativo da frequência de germinação e vigor das plântulas com os embriões zigóticos. As taxas de conversão de embriões somáticos em plântulas pode ser variável, e a organização celular das regiões meristemáticas e o tamanho do vacúolo das células embriogênicas são identificados como fator que pode afetar a capacidade de germinação do embrião somático (NICKLE; YEUNG, 1993; TAYLOR; VASIL, 1996).

Nos estádios iniciais, verificou-se que os embriões somáticos possuem coloração esbranquiçada (Figura 1A), enquanto os embriões somáticos cotiledonares têm coloração esverdeada (Figura 1B).

Os embriões zigóticos de jabuticaba-branca, em sua maioria, são esbranquiçados, têm na região dorsal uma coloração vermelho-arroxeadada por completo e, na região ventral, uma coloração vermelho-arroxeadada menos intensa, limitando se às bordas (Figura 1C). Embora os embriões somáticos cotiledonares possuam coloração esverdeada, de forma semelhante ao embrião zigótico, eles apresentam uma pequena mancha com coloração vermelho-arroxeadada nos cotilédones, mas com pouca intensidade (Figura 1D). Característica semelhante foi descrita por Bandyopadhyay e Hamill (2000), em *Eucaplytus nitens*, também pertencente à família Myrtaceae.

A plântula somática possui cotilédones verdes e radícula escurecida, devido aos compostos fenólicos formados (Figura 1F).



Figura 1 – Comparação da morfologia dos embriões somáticos e zigóticos em fase de maturação. A: embriões somáticos em diferentes estágios de maturação, predominando embriões globulares sob os calos com coloração esbranquiçada, com 15 dias de cultivo; B: comparação do tamanho de um embrião somático com 60 dias de cultivo com um zigótico retirado do fruto maduro; C: detalhe do embrião zigótico com coloração intensa de vermelho-arroxeadado e eixo embrionário (seta); D: embriões somáticos com manchas vermelho-arroxeadas; e E e F: plântula somática com ápices radicular e caulinar aos 60 dias de cultivo.

A baixa taxa de conversão dos embriões somáticos em plântulas pode ser devido à falta de organização da região meristemática, afetando a capacidade de germinação dos embriões somáticos (NICKLE; YEUNG, 1993; TAYLOR; VASIL, 1996).

Em dicotiledôneas, o desenvolvimento do embrião somático apresenta características morfológicas semelhantes às do embrião zigótico. O desenvolvimento de ambos os embriões é caracterizado por diferenciação de uma estrutura bipolar, ou seja, desenvolvimento de ápices caulinar e radicular (SMITH, 1985). Os estágios de desenvolvimento dos embriões somático e zigótico são semelhantes, e ambos passam pelos estágios globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (SMITH, 1985). Segundo Dodeman et al. (1997), os embriões somáticos não possuem endosperma nem tecido suspensor, podendo apresentar desenvolvimento anormal e também conter sistema vascular fechado, sem conexão vascular com os tecidos do explante inicial.

A comparação dos embriões somático e zigótico busca estabelecer marcadores qualitativos do padrão de desenvolvimento *in vitro* (GUERRA et al., 1999). Estudos anatômicos em *Tilia cordata* apontaram semelhanças no desenvolvimento do embrião somático em meio de cultura com o desenvolvimento *in situ* do embrião zigótico (KÄRKÖNEN, 2000).

De acordo com Fehér et al. (2003), diferenças morfológicas podem ser influenciadas pela composição do meio de cultura e pela fonte de explante. Em *Araucaria angustifolia*, os tipos morfológicos foram determinados pelo meio de cultura através da adição de fonte de carbono nesse meio (STEINER et al., 2003).

A manipulação das condições do meio de cultura também pode influenciar a frequência da embriogênese somática de jaboticaba-branca, como é provável que mudanças no ambiente de cultura de tecidos pode influenciar a expressão de um ou mais genes, que desempenham importante papel na ativação da formação dos embriões (DODEMAN et al., 1997). Outro fator é o oxigênio, utilizado como suprimento para o crescimento em tecidos de cenoura, que tem influência na produção de culturas com alto potencial para embriogênese somática (KESSELL; CARR, 1972).

4.2. Estudo Anatômico

Em cortes histológicos de explantes de jaboticaba-branca, realizados aos 20 dias após a incubação em meio de cultura contendo 2,4-D e IASP e corados com azul-de-toluidina e lugol, pode-se observar, no mesmo explante, formação de duas regiões

distintas de células em diferenciação, regiões embriogênicas com formação de pró-embriões (Figura 3B) e regiões meristemáticas não-organizadas, com elevada atividade mitótica (Figura 3C), apresentando na mesma seção células com coloração esverdeada com vacúolos cheios de compostos fenólicos. Em *Rosa* híbrida, qualquer uma das células com divisões internas formam diretamente embriões somáticos ou continuam a proliferar, resultando em calos embriogênicos (ROUT et al., 1998).

Os pró-embriões são formados por células pequenas com diminutos grãos de amido e paredes finas. As divisões celulares que resultaram na formação dessa organização ocorrem em vários planos, sendo os pró-embriões provenientes de células internas do tecido que forma o calo e apresentam regiões compostas por células bastantes fenolizadas (Figura 3B). À medida que se diferenciam, as células aumentam seu volume.

Os pró-embriões possuem células compactas, com núcleo e nucléolo proeminentes e reduzida vacuolização, apresentando, aparentemente, individualização em relação às células parenquimáticas vizinhas ricas em amido (Figura 3D). O amido de reserva é rapidamente utilizado durante a formação das regiões embriogênicas.

Algumas células maiores, vacuolizadas, são formadas na extremidade do calo e se desprenderam deste (Figura 3B). Células menores, com citoplasma denso, apresentam-se coradas, com tonalidades verdes, pelo azul-de-toluidina, indicando acúmulo de compostos fenólicos, possivelmente pela oxidação do tecido. Söndahl et al. (1979) relataram que as células do parênquima paliçádico tornam-se mais basofílicas com o passar do tempo de cultivo. Isso se deve ao acúmulo de compostos fenólicos formados após a oxidação de substâncias produzidas no metabolismo secundário das células, formando novos compostos, como as quinonas. As substâncias produzidas são responsáveis pelo escurecimento dos explantes cultivados em meios semi-sólidos (MICHAUX-FERRIERE et al., 1997).

Na indução de embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de mamão (*Carica papaya*), utilizando 2,4-D, observou-se que a formação de calos ocorreu após 14 dias de cultivo, com origens distintas, através de células vacuolizadas alongadas e grandes, conferindo aparência friável ao tecido sob a epiderme do explante, e também ocorrendo internamente e apresentando células meristemáticas pequenas, compactas e organizadas, com citoplasma denso (FERNANDO et al., 2001).

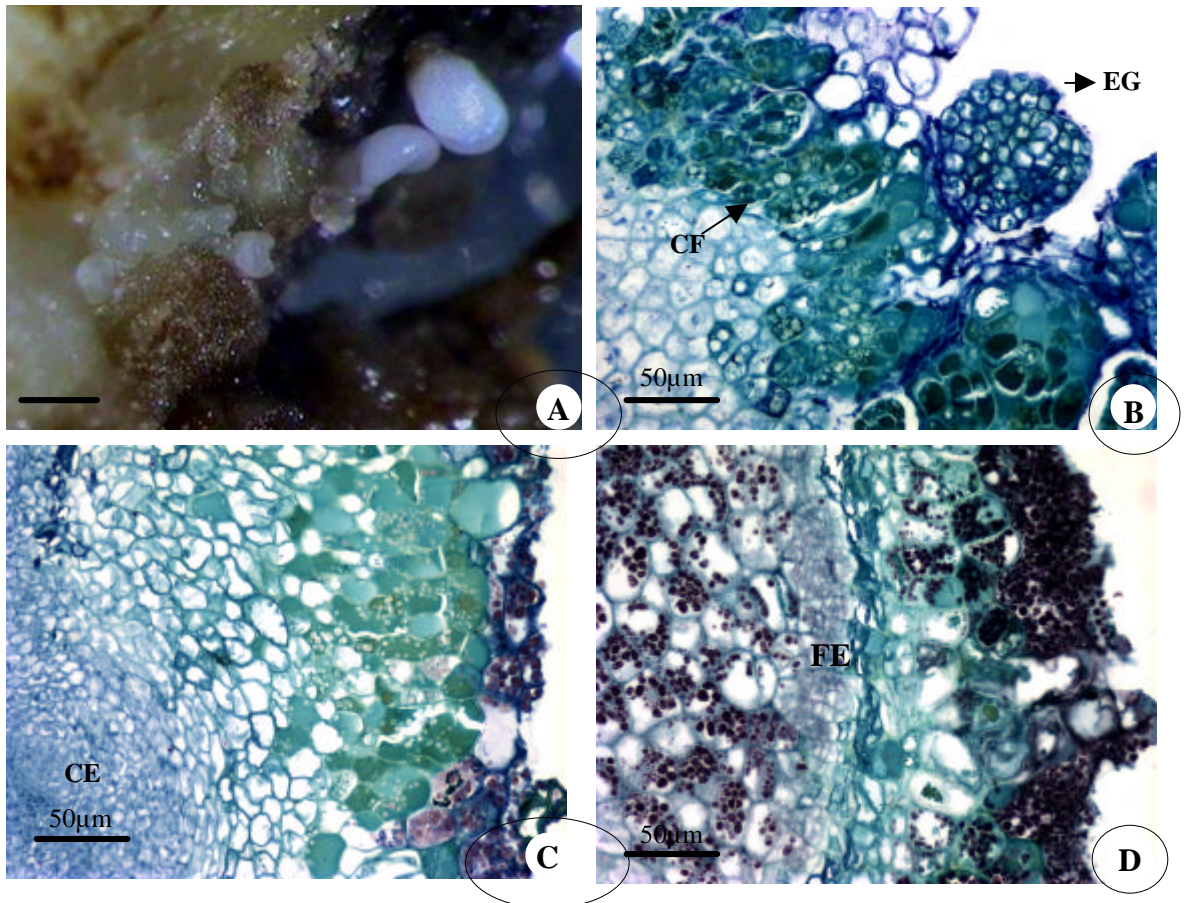


Figura 3 – Explante e regiões embriogênicas de jaboticaba-branca em meio de cultivo com 2,4-D e IASP. A: explante apresentando embriões globulares após 50 dias no primeiro meio de cultura e 17 no segundo; B: seção longitudinal do explante diferenciando em calos embriogênicos e embriões somáticos corados com azul-de-toluidina; C-D: proliferação de uma faixa contínua de células embriogênicas no explante zigótico; D: detalhe das células periféricas com amido e o início de dissolução da parede celular em explante com 20 dias de cultivo; **CF**: calo fenolizado; **CE**: células embriogênicas; **FE**: faixa de células embriogênicas; **GA**: grãos de amido; e **EG**: embrião globular.

Em jabuticaba-branca, a embriogênese somática ocorre a partir da formação de uma densa camada de células meristemáticas originadas da face adaxial dos cotilédones dos embriões zigóticos. À semelhança do desenvolvimento dos embriões somáticos de *Feijoa sellowiana*, também da família Myrtaceae, com os embriões somáticos originados a partir de uma única célula epidérmica e também a partir de um grupo de células meristemáticas próximas à superfície adaxial (CANHOTO; CRUZ, 1996). Em *Acca sellowiana*, embriões somáticos diferenciaram-se a partir da fragmentação de células do cotilédone do embrião zigótico, em centros meristemáticos, através da segregação celular e através da formação de uma camada de células periféricas circundando o centro meristemático, que demonstrava competência para embriogênese somática. Essas células competentes eram pequenas, isodiamétricas, e os vacúolos estavam preenchidos por compostos fenólicos (CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2004).

Para que o desenvolvimento dos embriões somáticos ocorra, há necessidade de se fazer o isolamento dos embriões globulares (YEUNG, 1995). Entre os fatores que afetam a embriogênese somática, o tempo de exposição à auxina (PARROTT et al., 1988) e o balanço e tipo de fontes nitrogenadas (NOMURA; KOMAMINE, 1995) podem desempenhar papel importante na indução.

Considerando o porcentual de explantes responsivos e a qualidade dos embriões somáticos, o período adequado de indução foi de três semanas, quando já se tem uma quantidade adequada de estruturas embriogênicas formadas. A permanência prolongada dos explantes em meio contendo auxina pode prejudicar a histodiferenciação do embrião somático, afetando a formação do meristema caulinar. Parrott et al. (1988) demonstraram que o tempo de exposição à auxina foi inversamente proporcional ao desenvolvimento do embrião somático de soja (*Glycine max*).

Cortes histológicos dos embriões somáticos (Figura 4) indicaram a presença de histodiferenciação da protoderme e do procâmbio (Figura 4 AB). Na fase torpedão, indicam diferenciação da faixa procambial e início do alongamento dos cotilédones (Figura 4E) e ausência, na maioria dos embriões, de meristemas apicais (Figura 4F), além da ausência também de acúmulo de substância de reserva (Figura 4). A presença de material de reserva foi verificada em alguns embriões somáticos, esporadicamente. Embriões somáticos apresentam células com vacúolo reduzido e citoplasma denso, enquanto os embriões zigóticos exibem grande quantidade de grãos de amido em amiloplastos.

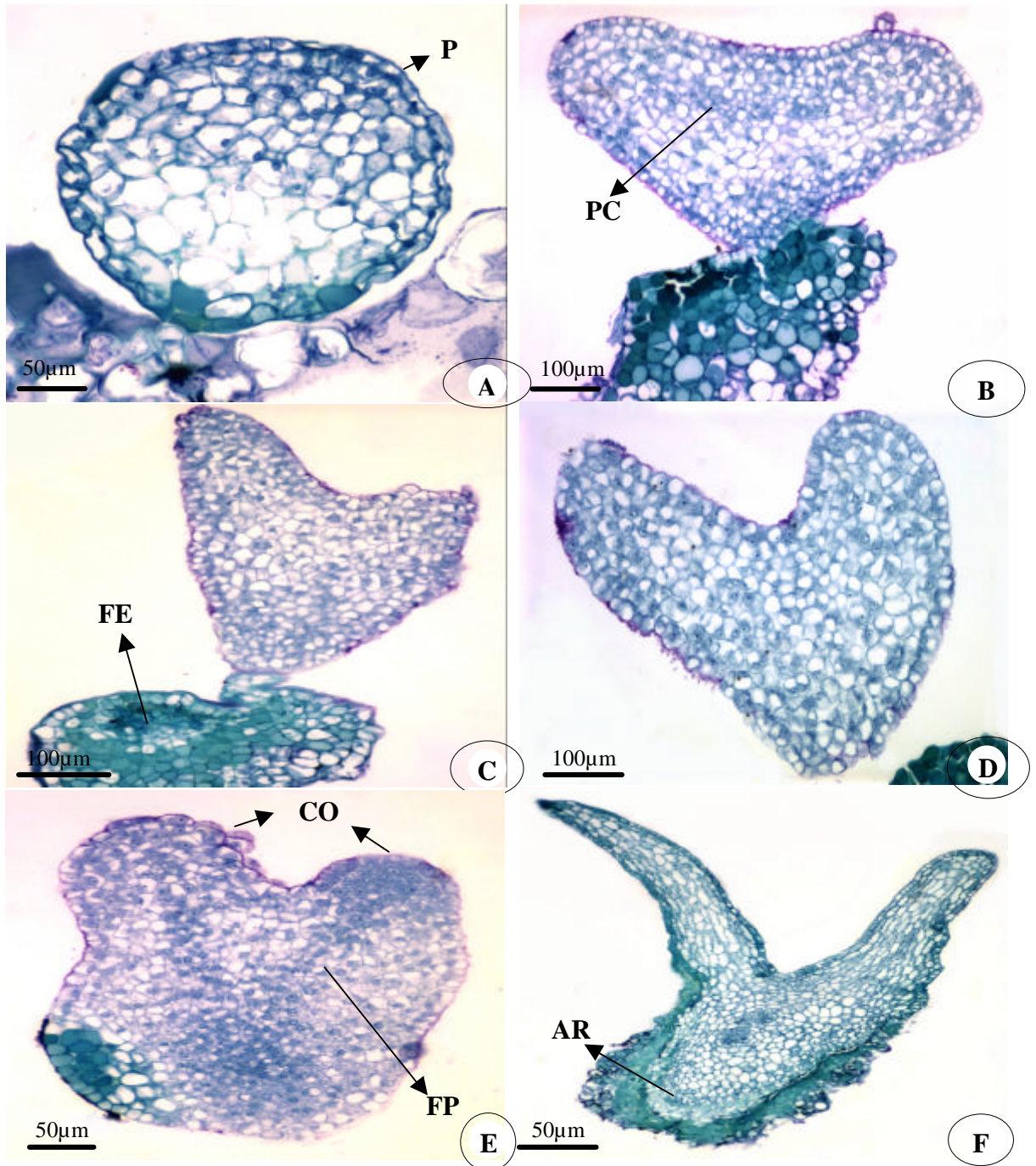


Figura 4 – Secções longitudinais do embrião somático de jaboticaba-branca coradas com azul-de-toluidina nos estádios de maturação. A: embrião globular com formação completa da protoderme; B: embrião cordiforme com protoderme e início da formação do procâmbio; C: embrião torpedo com células calosas na base totalmente fenolizadas; D: embrião pré-cotiledonar; E: embrião cotiledonar com as faixas procâmbiais evidentes; e F: embrião com cotilédones abertos circundado por células cobertas por compostos fenólicos e sem evidência do meristema apical. **PT** - protoderme; **PC** - procâmbio; **FE** - fenóis; **CO** - cotilédones; **FP** - faixa procâmbial; e **AR** - ápice radicular.

Também se podem observar os diferentes estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos de jabuticaba-branca, através da eletromicrografia de varredura (Figura 5).

A conversão desses embriões em plantas foi baixa neste experimento, provavelmente pela ausência de desenvolvimento do meristema caulinar. Características semelhantes foram verificadas em *Musa* spp. (LEE et al., 1997) e em *Daucus carota* (NICKLE; YEUNG, 1993).

Fischer e Neuhaus (1996) verificaram um bloqueio do meristema caulinar em embriões somáticos de *Triticum aestivum* induzidos com 2,4,5-T, devido à intensa vascularização dos meristemas. O estabelecimento da polaridade representa o início de desenvolvimento das principais estruturas embriogênicas em monocotilédones, como o eixo embrionário e o escutelo.

No estágio inicial do desenvolvimento do embrião somático, o transporte polar da auxina é essencial para o estabelecimento da simetria bilateral (LIU et al., 1993); caso ocorra homogeneização da distribuição de auxina no próprio embrião, pode comprometer a simetria bilateral, devido ao aumento desse hormônio em nível endógeno, pela presença de auxina exógena (FISCHER; NEUHAUS, 1996). A concentração e o tempo de utilização da auxina na fase de indução, associada ao estágio de maturação do embrião, que permite o estabelecimento e desenvolvimento do meristema caulinar, são essenciais para a qualidade do embrião somático, visando à conversão em plântulas.

Na embriogênese, o que marca o início da histodiferenciação do embrião é a formação da protoderme (YEUNG, 1995), que é o tecido de revestimento do embrião. Em jabuticaba-branca, verificam-se formação completa da protoderme e início de formação do procâmbio (Figura 5). Segundo Yeung (1995), a protoderme é essencial para o desenvolvimento do embrião somático, e há paralisação no desenvolvimento de embriões somáticos de cenoura ocasionada pela formação anormal da protoderme.

É necessário que haja estudos mais detalhados, visando à formação de embriões de melhor qualidade, os quais poderão apresentar maior facilidade de conversão em plantas. A qualidade do embrião somático, associada às fontes de nitrogênios nítrico e amoniacal e tempo de indução, bem como estágio de maturação, são requisitos fundamentais para a eficiência da embriogênese somática visando à conversão em plantas.

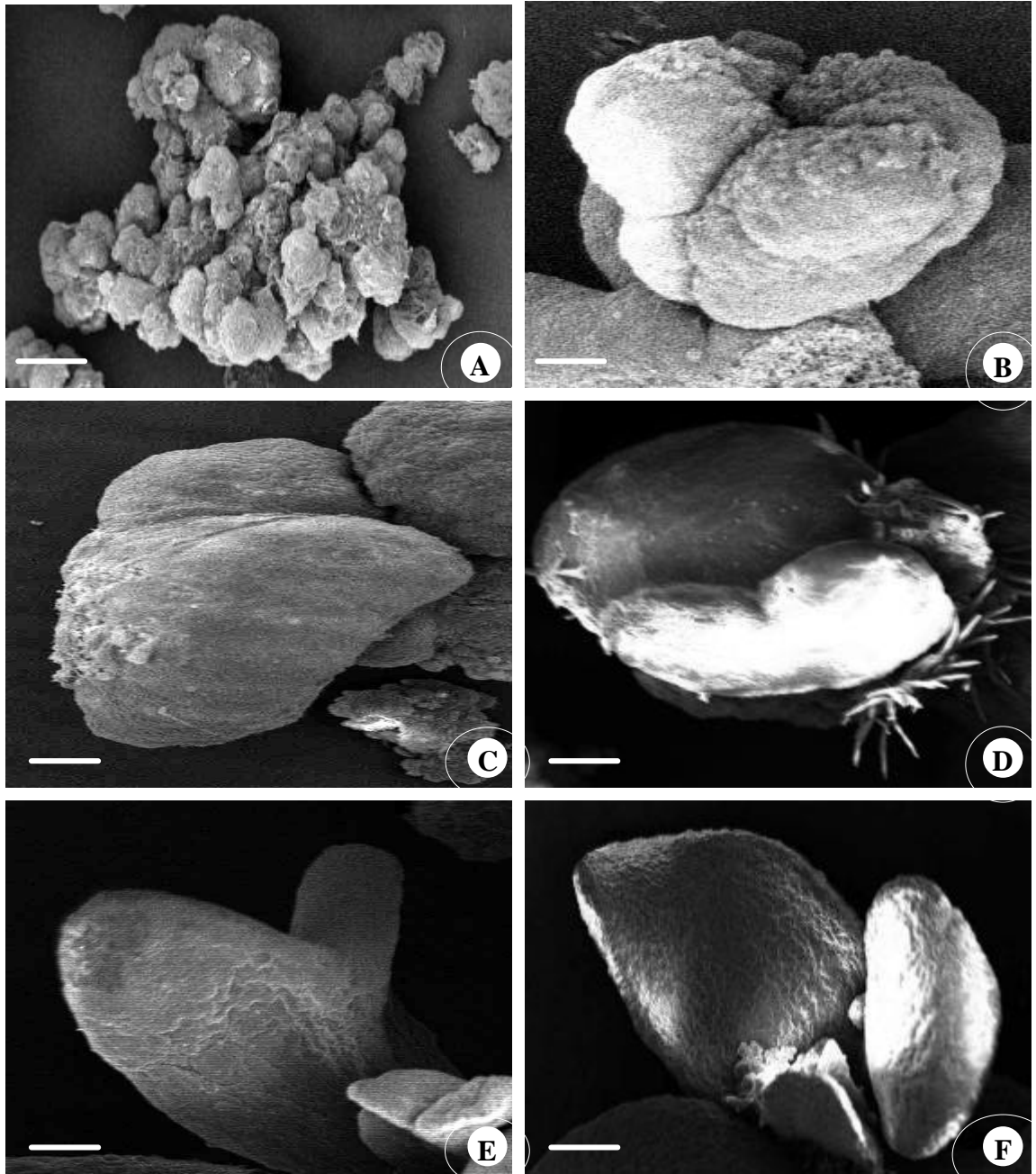


Figura 5 – Eletromicrografia de varredura de um calo embriogênico de jaboticababranca com 60 dias de cultivo em meio NN contendo 50 g L^{-1} de PEG 4000. A: vista geral dos embriões somáticos em diversos estádios de desenvolvimento; B: detalhe de embriões somáticos em estágio globular (EG); C: detalhe de um embrião pré-torpedo (PT); D: detalhe de um embrião torpedo (ET); E: embrião pré-cotiledonar (PC); e F: embrião cotiledonar (EC). Barras: A,E = $200 \mu\text{m}$; B,C,F = $300 \mu\text{m}$; e D = $100 \mu\text{m}$.

No presente trabalho, observou-se alta frequência de embriões morfológicamente anormais (Figuras 6 e 7). Entre as anomalias, podem-se verificar embriões com cotilédones fusionados formando estruturas cilíndricas (Figura 6C), embriões fundidos na porção basal ou por toda a extensão dos cotilédones, ou seja, com formação de embriões monocotiledonares (Figura 6AB) e embriões somáticos com ausência de meristema apical (Figura 6B). Foram observados também embriões com vários cotilédones e surgimento de outros embriões sobre estes com desenvolvimento de ápice radicular (Figura 6D). Embriões com formatos variados também podem ser encontrados (Figura 7).

Variações como essas foram descritas por Koehler (2004) e Fernando et al. (2001) em embriões somáticos de *Carica papaya*, em que essas observações foram correlacionadas com a baixa conversão em plântulas. Possivelmente a falta de contato da região do domo apical com o meio de cultivo seja desfavorável ao desenvolvimento normal dos embriões somáticos, contribuindo, também, para a assincronia no processo de maturação.

Para que haja resposta das culturas embriogênicas aos tratamentos de maturação, é preciso certo grau de organização morfológica (JALONEN; von ARNOLD, 1991; BOZHKOV et al., 2002; STASOLLA; YEUNG, 2003). Mo et al. (1996) descreveram a morfologia de embriões de *Picea abies* em células que continham um ápice embrionário definido e formavam embriões somáticos normais, com ápice embrionário pequeno e desorganizado, resultando na formação de embriões somáticos anormais.

Estudos anatômicos podem explicar as baixas taxas de conversão pelas anormalidades observadas durante a formação dos meristemas (DODEMAN et al., 1997). Podem ocorrer ausência ou deleção do meristema apical ou basal e mudanças na forma dos embriões, como a presença de vários cotilédones e cotilédones fusionados.

Culturas embriogênicas de *Carya illinoensis* induzidas com ANA desenvolveram células homogêneas, isodiamétricas e meristemáticas nas regiões embriogênicas, apresentando embriões somáticos normais (AMMIRATO, 1983). Enquanto Rodriguez e Wetzstein (1998), estudando *Carya illinoensis*, constataram desenvolvimento anormal dos embriões somáticos induzidos em meio de cultura com 2,4-D, com alta incidência de anormalidade, apresentando embriões fusionados e tubulares.

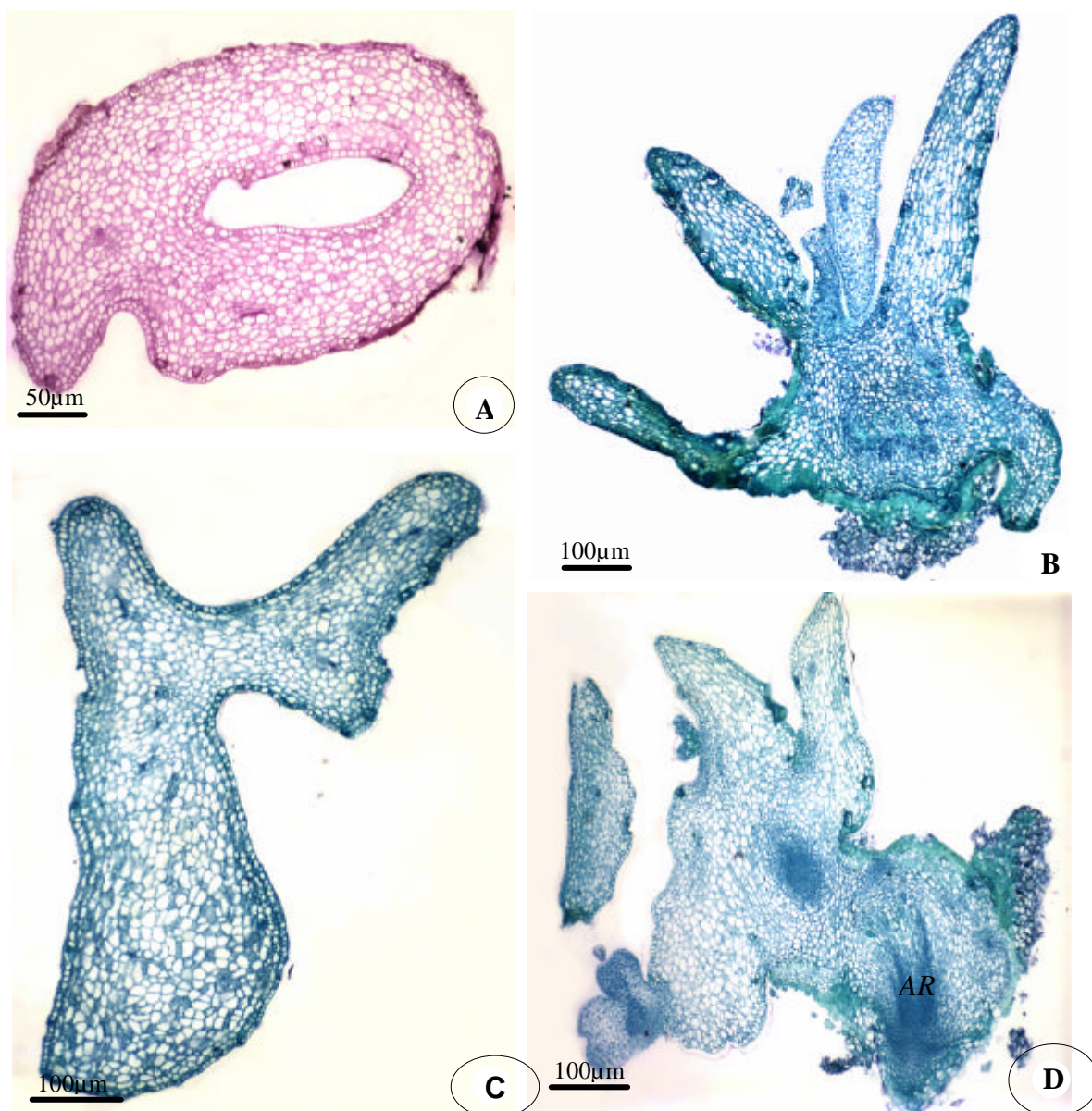


Figura 6 – Secções transversais (A e C) e longitudinais (B e D) dos embriões somáticos anormais de jaboticaba-branca corados com azul-de-toluidina e PAS nos estádios de maturação. A: embrião anormal em forma de trompete com cavidade corado com PAS; B: embrião cotiledonar com vários cotilédones formados; C: embrião cotiledonar fusionado com cotilédones malformados; e D: embrião cotiledonar com vários cotilédones com surgimento de outros embriões sobrepostos e ápice radicular (AR).

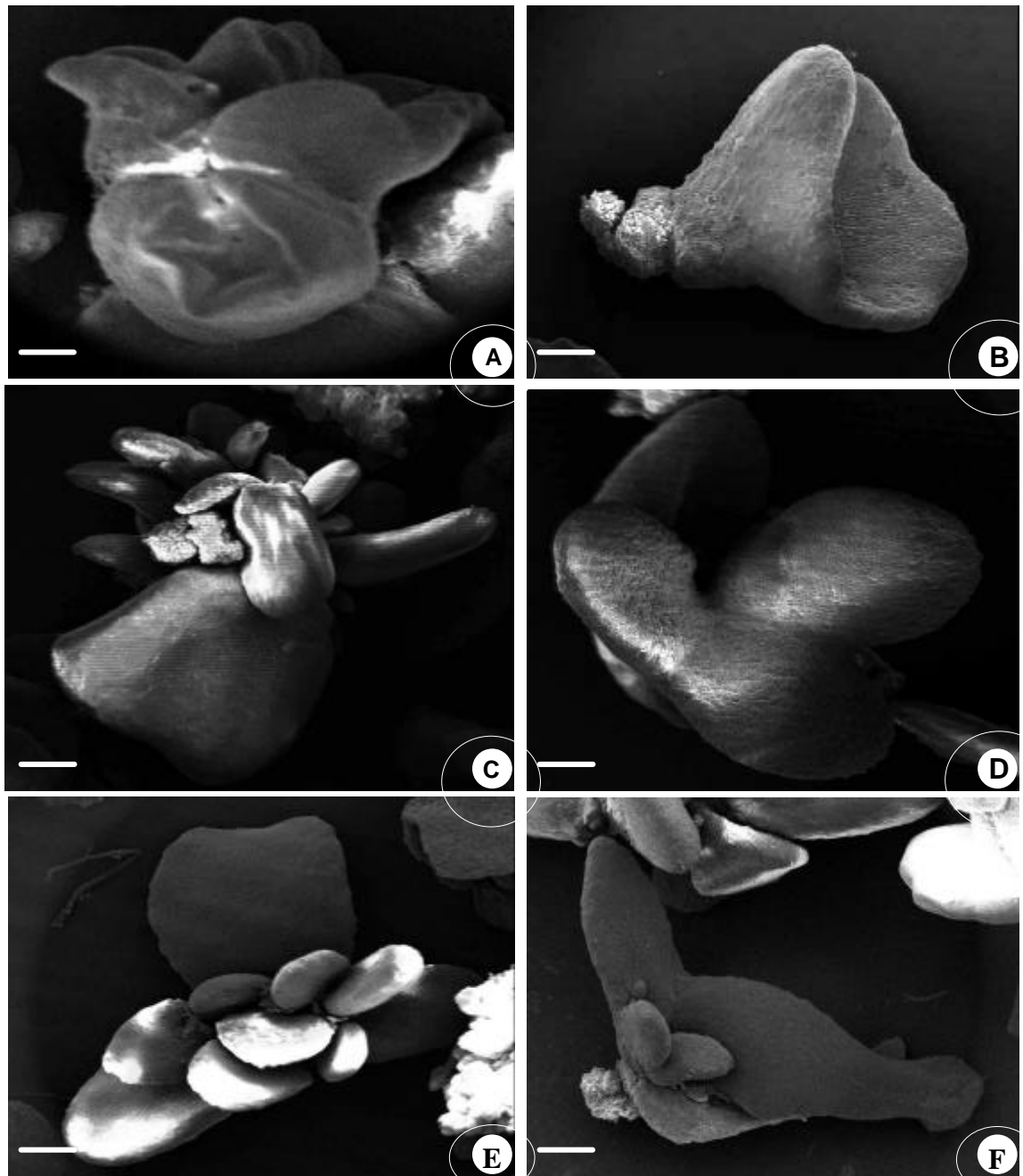


Figura 7 – Eletromicrografia de embriões morfologicamente anormais de jaboticaba-branca. A: embrião em forma de um jarro com três cotilédones; B: embrião com cotilédones fusionados em forma de trompete; C: embrião com vários embriões monocotiledonares sobre ele; D: embrião fusionado com três cotilédones; E: vários embriões sobrepostos; e F: embrião com cotilédones malformados e outro embrião cotiledonar formando sobre ele. Barras: F = 300 μm ; C,D,E = 200 μm ; e A,B = 400 μm .

Várias das anormalidades observadas em embriões somáticos são atribuídas à suplementação do meio de cultivo com 2,4-D (GUERRA et al., 1999), também observado por Cangahuala-Inocente et al. (2004), em *Acca sellowiana*. Canhoto e Cruz (1996) verificaram em *Acca sellowiana* a ocorrência de embriões somáticos anormais e atribuíram esse fato à origem multicelular dos embriões. Paiva-Neto et al. (2003), estudando a regeneração de urucum (*Bixa orellana*), obtiveram plantas com considerável desenvolvimento de raízes, mas sem desenvolvimento de parte aérea.

As seções transversais e longitudinais dos embriões somáticos apresentaram desenvolvimento semelhante das estruturas encontradas no embrião zigótico (Figura 8). Os embriões somáticos exibiram morfologia e organização celulares internas com protoderme evidente, meristema fundamental e região procâmbial semelhantes ao que apresentou o embrião zigótico obtido de sementes maduras (Figura 8 A-C). Porém, o procâmbio dos embriões somáticos é menos evidente, em comparação com o procâmbio nos embriões zigóticos.

Nos cotilédones dos embriões somáticos e zigóticos foi observada uma protoderme, porém esta, nos embriões zigóticos, já está bem mais diferenciada (Figura 8 A-D). No presente estudo, fortes semelhanças foram verificadas na padronização celular dos meristemas apicais em ambos (embriões somáticos e zigóticos), bem como uma extensão de células completamente vacuolizadas em ambos os tipos de embriões. Isso pode evidenciar que a seqüência de desenvolvimento de eventos que levaram à formação dos embriões somáticos foi semelhante à que levou à formação dos embriões zigóticos durante o processo de desenvolvimento de sementes em jabuticaba-branca. Desse modo, tais observações são encorajadoras para as investigações contínuas do desenvolvimento das culturas de jabuticaba-branca, que são capazes de produzir embriões somáticos completamente desenvolvidos.

Os embriões somáticos têm um par de cotilédones menor e com diâmetro reduzido, enquanto os embriões zigóticos têm um par de cotilédones maior e com muito mais material de reserva do que os embriões somáticos (Figura 8AD). Isso se deve ao fato do maior grau de diferenciação dos tecidos cotiledonares do embrião zigótico, que já apresenta um parênquima de reserva rico em amiloplastos e cordões procâmbiais com certo grau de diferenciação. O amido é um polissacarídeo de reserva que se acumula nos tecidos vegetais, sendo um dos principais substratos metabólicos (MARENCO; LOPES, 2005). Embriões somáticos e zigóticos têm semelhanças na natureza do material de reserva, embora os embriões somáticos tenham níveis bem baixos de material de reserva

nas células cotiledonares, em comparação com embriões zigóticos; os embriões somáticos possuem altos níveis de compostos fenólicos. Do ponto de vista prático, a formação das estruturas dos embriões somáticos semelhantes aos embriões zigóticos obtidos de sementes maduras e que contêm material de reserva, ou seja, células ricas em grãos de amido, pode ser importante para os programas de biotecnologia comerciais na propagação massal de clones-elite de jabuticaba-branca. Von Arnold et al. (2002) observaram que somente embriões maduros com morfologia normal conseguiram acumular quantidade suficiente de substâncias de reserva e, com isso, adquirir tolerância à dessecação e, no final da maturação, conversão em plantas normais. Também se pode observar que, em ambos, os cotilédones apresentam cavidades secretoras já com certo grau de diferenciação, próximas à protoderme, que é uma característica da família Myrtaceae (Figura 8 EF).

A anatomia comparativa realizada em *Tilia cordata* confirmou que o desenvolvimento *in vitro* de embriões somáticos foi semelhante ao desenvolvimento *in situ* de embriões zigóticos (KÄRKÖNEN, 2000). Entretanto, em algumas espécies observaram-se diferenças quanto ao desenvolvimento inicial do embrião somático, em comparação com o embrião zigótico.

Segundo Mathew e Philip (2003), a célula inicial competente, que dará origem ao embrião somático de *Ensete superbum*, sofre divisão simétrica, originando duas células semelhantes, enquanto a primeira divisão celular que ocorre no zigoto é altamente polarizada, dando origem a duas células distintas. Também foi verificado que nos estádios iniciais os embriões somáticos apresentaram menor acúmulo de grânulos de amido, em comparação com a quantidade de amido dos embriões zigóticos.

Segundo Egertsdotter e Von Arnold (1998), a morfologia celular pode ser associada com a competência embriogênica. A fonte de explante e a composição do meio de cultura podem influenciar as diferenças encontradas na morfologia celular (FEHER et al., 2003). Os tipos morfológicos observados em *Araucaria angustifolia* foram determinados pela fonte de carbono presente no meio de cultura (STEINER et al., 2003).

É necessário que haja organização morfológica das culturas embriogênicas, para que se tenham respostas aos tratamentos de maturação (JALONEN; Von ARNOLD, 1991; BOZHKOV et al., 2002; STASOLLA et al., 2003).

Os fitorreguladores adicionados no meio de cultivo para se obter a indução da embriogênese somática pode causar alterações na polaridade celular e promover subseqüentes divisões assimétricas (AMMIRATO, 1983).

A presença de pequeno grupo de embriões globulares sem uma polaridade visível foi denominada pró-embriões, enquanto aqueles que possuem polaridade preestabelecida foram associados aos estádios subseqüentes da embriogênese (CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2004a). Características semelhantes foram observadas em *Panicum maximum* (KARLSSON; VASSIL, 1986) e *Quercus suber* L. (PUIGDERRAJOLS et al., 2001).

Segundo Branca et al. (1994), na morfologia *in vitro* o material de reserva desempenha papel importante, com níveis altos de polissacarídeos no início do processo de desenvolvimento *in vitro*. O consumo do material de reserva pode ser correlacionado com o impulso para a embriogênese somática (MANGAT et al., 1990; MARTIN et al., 2000). Os grânulos de amido consumidos dos centros meristemáticos estão relacionados com o fornecimento de energia para a formação de embriões somáticos (MARTIN et al., 2000; CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2004a).

O acúmulo de amido na camada de células subepidérmicas do explante foi correlacionado com a formação de células embriogênicas em *Carya ellinoensis*, onde o consumo dos grânulos de amido era rápido para a formação da região embriogênica (RODRIGUEZ; WETZSTEIN, 1998). O amido é a fonte primária de energia para o crescimento celular e a proliferação das células, em que pode ser rapidamente metabolizado em tecidos embriogênicos, fornecendo energia para a atividade mitótica e etapas do metabolismo celular (STAMP, 1987).

Em *Eucalyptus urophylla* foram observados sítios de síntese de proteínas em grupos de células embriogênicas (ARRUDA et al., 2000). Em *Acca sellowiana*, nos centros meristemáticos que originavam os embriões somáticos foram verificados compostos fenólicos (CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2004a). Tais compostos parecem inibir a hiperidricidade, atuando como precursor da síntese de lignina, como visto em *Eucalyptus nitens* (BANDYOPADHYAY; HAMILL, 2000).

Embriões somáticos globulares de *Acca sellowiana* foram caracterizados com poucos grânulos de amido e com a presença de corpos protéicos mais abundantes, enquanto nos estádios torpedo e pré-cotiledonar foi observado grande quantidade de grânulos de amido, associados como estratégia dos embriões somáticos para fornecimento de energia para conversão em plantas (CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2004a).

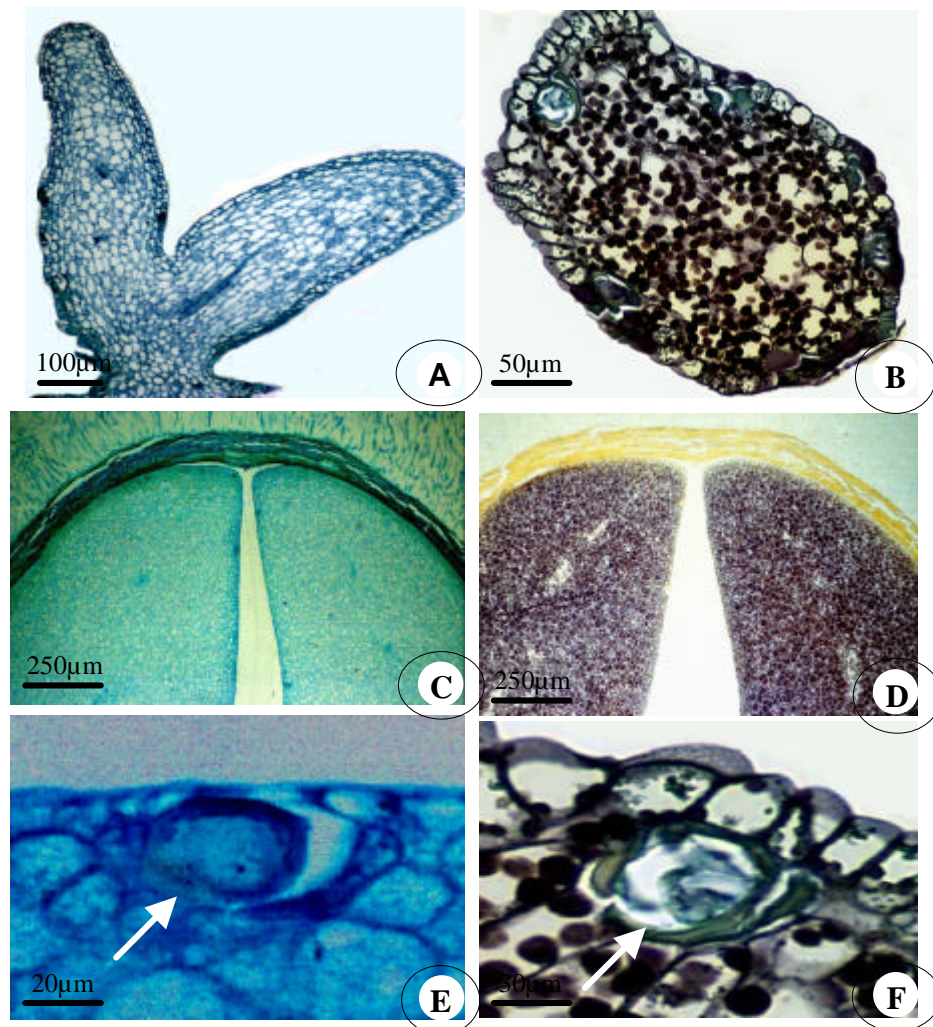


Figura 8 – Embriões cotiledonares de jaboticaba-branca. A: embrião somático cotiledonar corado com azul-de-toluidina; B: detalhe do embrião somático corado com azul de toluidina e lugol, evidenciando os grãos de amido; C: detalhe do embrião zigótico corado com azul-de-toluidina; D: embrião zigótico corado com lugol, evidenciando os cotilédones com grãos de amido; E: detalhe da cavidade secretora (seta) do cotilédone do embrião zigótico; e F: detalhe da cavidade secretora (seta) do cotilédone do embrião somático.

5. CONCLUSÕES

Os resultados permitiram a conclusão de que existem semelhanças na morfologia dos embriões somáticos e zigóticos, ambos com desenvolvimento de um par de cotilédones. Análises histológicas apontaram o desenvolvimento dos pró-embriões, os quais dão origem a embriões somáticos morfologicamente semelhantes a embriões zigóticos, porém os embriões zigóticos de jabuticaba-branca apresentam procâmbio bem mais desenvolvido e muito mais material de reserva, sendo seu tamanho 10 vezes maior que o dos embriões somáticos.

Nas análises histológicas dos embriões somáticos, observaram-se diversas anomalias, o que impede a conversão desses embriões em plântulas. Além dessas anomalias, a falta de meristema apical também colabora com a baixa conversão em plântulas.

A análise dos embriões somáticos e zigóticos comprovaram que o material de reserva de ambos é o amido, porém nos embriões somáticos a quantidade de amido observada é bem menor e ocorre esporadicamente.

Através das análises histológicas, observou-se que os embriões somáticos passam pelos diferentes estádios de desenvolvimento, ou seja, globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar.

REFERÊNCIAS

- ALEMANNI, L.; BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIERE, N. A comparison between *Theobroma cacao* L. zygotic embryogenesis and somatic embryogenesis from floral explants. ***In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant***, v. 33, p. 163-172, 1997.
- ALIZADEH, S.; MANTELL, S. H. Early cellular events during direct somatic embryogenesis in cotyledon explants of *Solanum aciculare* Forst. ***Annals of Botany***, v. 67, p. 257-263, 1991.
- AMMIRATO, P. V. Embryogenesis. In: EVANS, D.A. et al. (Eds.). ***Handbook of plant cell culture***. New York: MacMillian Publishing Co, 1983. v. 1, p. 82-123.
- AMMIRATO, P. V. Patterns of development in culture. In: HENKE, R. R. et al. (Eds.). ***Tissue culture in forestry and agriculture***. New York: Plenum, 1985. p. 9-29.
- ARRUDA, S. C. C. et al. Anatomical and biochemical characterization of the calcium effect on *Eucalyptus urophylla* callus morphogenesis *in vitro*. ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, v. 63, p. 143-154, 2000.
- ATTREE, S. M.; DUNSTAN, D. I.; FOWKE, L. C. White spruce (*Picea glauca* Moench) Voss and black spruce (*Picea mariana*) Mill B.S.P. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). ***Trees***. Berlin: Springer-Verlag, 1991. p. 423-445. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 1).
- ATTREE, S. M.; FOWKE, L. C. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, v. 35, p. 1-35, 1993.
- BANDYOPADHYAY, S.; HAMILL, J. D. Ultrastructural studies of somatic embryos of *Eucalyptus nitens* and comparisons with zygotic embryos found in mature seeds. ***Annals of Botanic***, v. 86, p. 237-244, 2000.

BANERJEE, N. et al. Aspects and prospects of somatic embryogenesis in *Musa*, ABB, cv. Bluoggoe. **Acta Horticulturae**, n. 212, p. 727-730, 1987.

BEVERSDORF, W. D.; BINGHAM, E. T. Degrees of differentiation obtained in tissue cultures of *Glycine* species. **Crop Science**, v. 17, p. 307-311, 1997.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds**: physiology of development and germination. New York: Plenum Press, 1994. cap. 1, p. 1-33. (Seeds: germination, structure and composition).

BOZHKOVA, P. V.; FILONOVA, L. H.; VON ARNOLD, S. A key developmental switch during norway spruce somatic embryogenesis is induced by withdrawal of growth regulators and is associated with cell death and extracellular acidification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 77, n. 6, p. 20, 2002.

BRANCA, C. et al. Early phases “*in vitro*” culture tomato cotyledons: starch accumulation and protein pattern in relation to the hormonal treatment. **Protoplasma**, v. 182, p. 59-64, 1994.

BUCHHEIM, J. A.; COLBURN, S. M.; RANCH, J. P. Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth. **Plant Physiology**, v. 89, p. 768-775, 1989.

CANGAHUALA-INOCENTE, G-C. et al. Morfo-histological analysis and histochemistry of *Acca sellowiana* somatic embryogenesis. **Protoplasma, Karlsruhe**, 2004a.

CANHOTO, J. M.; CRUZ, G. S. Feijoa sellowiana Berg (Pineapple guava). In: BAJAJ, Y.P.S, (Ed.). **Biotechnology in agriture and forestry**. Berlin: Springer-Verlag, 1996. p. 155-171. (v. 35 – Trees IV).

CAPUANA, M.; DEBERGH, P. C. Improvement of the maturation and germination of horse chestnut somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 48, p. 23-29, 1997.

CARASCO, C. et al. Ontogenèse comparative de l'embryogenèse zygotique et somatic chez *Coffea* sp. **Café Cacao Thé**, v. 38, n. 1, 1994.

CARMELLO-GUERREIRO, S. M. Técnica de inclusão de material vegetal em historresina. In: ENCONTRO REGIONAL DE ANATOMISTAS DO ESTADO DE SÃO PAULO, 1., 1995, Rio Claro. Rio Claro, SP: UNESP, 1995 . 7 p. (apostila).

CHANDEL, K. P. S. et al. Disiccation and freezing sensitivity in recalcitrant seed of tea, cocoa and jackfruit. **Annals of Botany**, v. 75, p. 443-450, 1995.

CÔTE, F. X. et al. Embryogenic cell suspensions from the male flower of *Musa* AAA CV. Grand Nain. **Physiologia Plantarum**, v. 97, p. 285-290, 1996.

CRISTIANSO, M. L.; WARNICK, D. A.; CARLSON, P. S. A morphogenetically competent soybean suspension culture. **Science**, v. 222, p. 632-634, 1983.

- CRONAUER-MITRA, S. S.; KRIKORIAN, A. D. Somatic embryos from cultured tissues of triploid plantains (*Musa* 'ABB'). **Plant Cell Reports**, v. 2, p. 289-291, 1983.
- DE KLERK, G. J. et al. Regeneration of roots, shoots and embryos and embryos: physiological, biochemical and molecular aspects. **Biologia Plantarum**, v. 39, p. 53-66, 1977.
- DODEMAN, V. L.; DUCREUX, G.; KREIS, M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, p. 1439-1509, 1997.
- DONADIO, L. C. Study of some Brazilian Myrtaceae in Jaboticabal, São Paulo, Brazil. **Proceedings Interamerican Society for Tropical Horticulture**, v. 40, p. 54-56, 1996.
- DONADIO, L. C. **Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg)**. Jaboticabal, SP: Funep, 2000. 55 p.
- EGERTSDOTTTER, U.; VON ARNOLD, S. Development of somatic embryos in Norway spruce. **Journal Experimental Botanic**, v. 49, p. 155-162, 1998.
- ESCALANT, J. V.; TEISSON, C. Comportments *in vitro* de l'embryon isolé du bananier (*Musa* species). **Fruits**, v. 42, p. 333-342, 1987.
- ESCALANT, J. V.; TEISSON, C.; COTE, F. Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 30, p. 181-186, 1994.
- FEHÉR, A.; PASTERMAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, p. 201-228, 2003.
- FERNANDO, J. A. et al. Anatomy of somatic embryogenesis in *Carica papaya* L. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 44, n. 3, p. 247-255, 2001.
- FILIPPI, S. B.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; RODRIGUES, A. P. M. Variações morfológicas de embriões somáticos obtidos a partir de inflorescências de bananeira. **Scientia Agrícola**, v. 58, n. 4, p. 711-716, 2001.
- FIRN, R. D. Growth substance sensitivity: the need for clearer ideas, precise terms and purposedful experiments. **Physiol. Plant.**, v. 67, p. 267-272, 1986.
- FISCHER, C.; NEUHAUS, G. Influence of auxin on the establishment of bilateral symmetry in monocots. **The Plant Journal**, v. 9, p. 659-669, 1996.
- FOBERT, P. R.; WEBB, D. T. Effect of polyamines, polyamine precursors, biosynthetic inhibitors on somatic embryogenesis from eggplant (*Solanum melongena*) cotyledons. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 66, p. 1434-1742, 1988.
- FUJJI, J. A. A. et al. Alfafa somatic embryo maturation and conversion to plants. **Plant Science**, v. 72, p. 93-100, 1990.

GAMBORG, O. L.; DAVIS, B. P.; STAHLHUT, R. W. Somatic embryogenesis in cell culture of *Glycine* species. **Plant Cell Reports**, v. 2, p. 209-212, 1983.

GAMA, M. J. C. S. **Produção de plantas transgênicas de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) por transformação de calos embriogênicos por meio de *Agrobacterium tumefaciens***. Rio de Janeiro: UFRJ, 1993. 130 f. Tese (Doutorado).

GARRET, R. E. Encapsulation machinery. In: REDENBAUGH K. (Ed.). **Synseeds: applications of synthetic seeds to crop improvement**. Boca Raton: CRC Press, 1993. p. 203-214.

GLEDDIE, S.; KELLER, W. A.; SETTERFIELD, G. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf and cell suspension of *Solanum melongena* (eggplant). **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 61, p. 656-666, 1983.

GOH, D. K. S. et al. Evidence of somatic embryogenesis from root tip explants of the rattan *Calamus manan*. **In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 35, p. 424-427, 1999.

GRAY, D. J.; PUROHIT, A. Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 10, p. 33-61, 1991.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRAS, J.B. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. v. 2, p. 533-568.

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

GUERRA, M. P. et al. Somatic embryogenesis in *Feijoa sellowiana*: Genotype Response, Auxini shock and Synthetic Seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, p. 117-128, 2001.

GUIMARÃES, O. Frutas – Festa no pomar. **Globo Rural**, p. 35-37, 1992.

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

HALPERIN, W. *In vitro* embryogenesis: some historical issues and unresolved problems. In: THORPE, T. A. (Ed.). **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 1-16.

HARADA, J. J. Signaling in plant embryogenesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, p. 23-27, 1999.

JABOTICABA. **Guia Rural**, p. 331, 1986.

JALONEN, P.; VON ARNOLD, S. Characterization of embryogenic cell lines of *Picea abies* in relation to their competence for maturation. **Plant Cell Reports**, v. 10, p. 384-387, 1991.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc, 1940. 423 p.

KÄRKÖNEN, A. Anatomical study of zygotic and somatic embryos of *Tilia cordata*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 61, p. 205-214, 2000.

KARLSSON, S. B.; VASIL, L. K. Morphology and ultrastructure of embryogenic cell suspension cultures of *Panicum maximum* (Guinea grass) and *Pennisetum purpureum* (Napier grass). **American Journal of Botanic**, v. 73, p. 894-901, 1986.

KERNS, H. R. et al. Correlation of cotyledonary node proliferation and somatic embryoid development in suspension cultures of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). **Plant Cell Reports**, v. 5, p. 140-143, 1986.

KESSEL, R. H. J.; CARR, A. H. The effect of dissolved oxygen concentration on growth and differentiation of carrot (*Daucus carota*) tissues. **Journal of Experimental Biology**, v. 23, p. 996-1007, 1972.

KOEHLER, A. D. **Embriogênese somática em mamoeiro (*Carica papaya* L.): anatomia, histoquímica e influência de ACC, AVG e STS e de pulsos de 2,4-D**. Viçosa, MG: UFV, 2004. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

LEE, K. S. et al. Histology of somatic embryo initiation and organogenesis from rhizome explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 51, p. 1-8, 1997.

LEÓN, J. **Botânica de los cultivos tropicales**. 2. ed. San José, Costa Rica: IICA, 1987. 120 p.

LI, B. J.; LANGRIDGE, W. H. R.; SZALAY, A. A. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in the soybean, *Glycine max*. **Plant Cell Reports**, v. 4, p. 344-347, 1985.

LI, X. Y. et al. Polyethethlene glycol and maltose enhance somatic embryo maturation in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). **In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 34, p. 22-26, 1998.

LITZ, R. E. In vitro responses of adventitious embryos of two polyembryonic *Eugenia* species. **HortScience**, v. 19, p. 720-722, 1984a.

LITZ, R. E. In vitro somatic embryogenesis from callus of jaboticaba. *Myrciaria cauliflora*. **HortScience**, v. 19, p. 62-64, 1984b.

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

- MAIA, V. **Técnica histológica**. São Paulo: Atheneu, 1979. 298 p.
- MARRENCO, R. A.; LOPES, N. F. **Fisiologia vegetal**: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral. Viçosa, MG: UFV, 2005. 451 p.
- MARROQUIN, G.; WILLIAMS, E. G. Somatic embryogenesis and plant regeneration through cell suspensions in *Musa acuminata*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 29, p. 43-46, 1993.
- MARTIN, A. B. et al. Differences in the contents of total sugars, starch and sucrose in embryogenesis and non-embryogenic calli from *Medicago arborea* L. **Plant Science**, v. 154, p. 143-151, 2000.
- MATHEW, M. M.; PHILIP, V.J. Somatic embryogenesis versus zygotic embryogenesis in *Ensete superbum*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 72, p. 267-275, 2003.
- MATTOS, J. R. **Jaboticabeiras**. Porto Alegre: Instituto de Pesquisas de Recursos Naturais Renováveis “AP”. 1983. 73 p.
- MENDONÇA, R. M. N. **Maturação, secagem e armazenamento de sementes e propagação vegetativa de jaboticabeiras (*Myrciaria spp.*)**. Viçosa, MG: UFV, 2000. 136 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- MERKLE, S.; PARROTT, W.; FLINN, B. S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE, T.A. (Ed.) **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 155-203.
- MICHAUX-FERRIÈRE, N.; DUBLIN, P. S.; SCHWENDIMAN, J. Etude histologique de l'embryogenèse somatique à partir d'explantas foliaires de *Coffea Arabica* L. **Café Caçãõ Thé.**, v. 31, p. 103-111, 1987.
- MICHAUX-FERRIÈRE, N.; CARRON, M. P. Histology of early somatic embryogenesis. In *Hevea brasiliensis*: The importance of timing of subculturing. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 19, p. 234-256, 1989.
- MICHAUX-FERRIÈRE, N.; SCWENDIMAN, J. Histology of somatic embryogenesis. In: DATTÉE, Y.; DUMAS, C.; GALLIS, A. (Eds.). **Reproductive biology and plant breeding**. Biotrop-CIRAD: Springer-Verlag, 1992. p. 247-259.
- MICHAUX-FERRIÈRE, N.; DUBLIN, P. S.; SCWENDIMAN, J. Etude histologique de l'embryogenèse soamtique à partir d'explantas foliaires de *Coffea Arabica* L. **Café Caçãõ Thé.**, v. 31, p. 103-111, 1987.
- MISRA, S. et al. Effect of abscisic acid, osmoticum and desiccation on synthesis of storage proteins during the development of white spruce somatic embryos. **Annals of Botany**, v. 71, p. 11-22, 1993.

- MOHAN RAM, H. Y. et al. Haploid induction in legumes. In: FUJIWARA, A. (Ed.). **Plant tissue culture**. Tokyo: Japanese Association for Plant Tissue Culture, 1982. p. 541.
- MONNIER, M. Culture of zygotic embryos. In: THORPE, T. A. (Ed.). **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 117-153.
- MOTOIKE, S. Y. et al. Somatic embryogenesis and term maintenance of embryogenic lines from fox grapes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 66, p. 121-131, 2001.
- MOTOIKE, S. Y. et al. SIMPÓSIO APLICAÇÕES DE BIOTECNOLOGIA NA CONSERVAÇÃO DE RECURSOS VEGETAIS *IN VITRO*, 55.; CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA E ENCONTROS DE BOTÂNICOS DE MG, BA E ES, 26., 2004, Viçosa. **Anais...** Viçosa, MG: UFV, 2004.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- MURALIDHARAN, E. M.; MASCARENHAS, A. F. In vitro plantlet formation by organogenesis in *Eucalyptus camaldulensis* and by somatic embryogenesis in *Eucalyptus citriodora*. **Plant Cell Reports**, v. 6, p. 256-259, 1987.
- MURALIDHARAN, E. M.; GUPTA, P. K.; MASCARENHAS, A. F. Plantlet production through high frequency samatic embryogenesis in long term cultures of *Eucalyptus citriodora*. **Plant Cell Reports**, v. 8, p. 41-43, 1989.
- NAKAMURA, T.; TANIGUCHI, T.; MAEDA, E. Studies on somatic embryogenesis of coffee by scanning electron microscope. **Japanese Journal of Crop Science**, v. 61, n. 3, p. 476-486, 1992.
- NAKAMURA, T.; TANIGUCHI, T.; MAEDA, E. Cyto-histological study on somatic embryogenesis of coffe: ultrastructural aspects. **Japanese Journal of Crop Science**, v. 63, p. 144-157, 1994.
- NAVARRO, C.; ESCOBEDO, R. M.; MAYO, A. *In vitro* plant regeneration from embryogenic cultures of a diploid and a triploid, Cavendish banana. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 51, p. 17-25, 1997.
- NICKLE, T. C.; YEUNG, E. C. Failure to establish a function shoot meristem may be a cause of conversion failure in somatic embryos of *Daucus carota* (Apiaceae). **American Journal of Botany**, v. 80, p. 1284-1291, 1993.
- NITSCH, J.P. Haploid plant from pollen. **Z. Pflanzenzuecht**, v. 63, p. 3-18, 1972.
- NOMURA, K.; KOMAMINE, A. Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE, T. A. (Ed.). **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 249-265.

NOVAC, F. J. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB)bananas (*Musa* spp.). **Bio/Tecnology**, v. 7, p. 154-159, 1989.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, p. 368-373, 1964.

PADMANABHAN, K. et al. Comparison of sweet potato *Ipomoea batatas* (L.) Lam. Using computer vision and histological analyses. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 685-692, 1998.

PAIVA-NETO, V. B. **Morfogênese in vitro de urucum (*Bixa orellana* L.)**. Viçosa, MG: UFV, 2002. 105 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

PARRA, R.; AMO-MARCO, J. B. Secondary somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle (*Myrtus communis* L.). **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 325-330, 1998.

PARROTT, W. A. et al. Optimization of somatic embryogenesis and embryo germination in soybean. **In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 24, p. 817-820, 1988.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: IBDF, 1984. v. 4, 450 p.

PRAKASH, C. S.; VARADARAJAN, U. Genetic transformation of sweetpotato. In: HILL, W.A.; BONSI, C.K.; LORETAN, P.A. (Eds.). **Sweetpotato technology for the 21th century**. Tuskegee: Tuskegee University, 1992. p. 27-37.

PUIGDERRAJOLS, P.; MIR, G.; MOLINAS, M. Ultrastructure of esrly embryogenesis by multicellular and unicellular pathways in cork oak (*Quercus suber* L.). **Annals of Botany**, v. 87, p. 179-189, 2001.

QUIROZ-FIGUEROA, F. R. et al. Histological studies on the developmental *Coffea arabica*. **Plant Cell Rep.**, v. 20, p. 1141-1149, 2002.

RAGHAVAN, V. **Experimental embryogenesis in vascular plants**. London, New York, San Franscisco: Academic Press, 1976. p. 349-381.

REDENBAUGH, K. **Synseeds**: applications of synthetic seeds to crop improvement. Boca Raton: CRC Press, 1993.

ROBERTS, D. R. et al. Abscisic acid and indole-3-butyric acid regulation of maturation and accumulation of storage proteins in somatic embryos of interior spruce. **Physiologia Plantarum**, v. 78, p. 355-360, 1990.

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

ROUT, G. R. et al. Histology of in vitro organogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of Rosa. **Biologia**, v. 53, p. 121-126, 1998.

ROYAL BOTANIC GARDENS KEW. **Micropropagation**. 2001. Disponível em: <<http://www.rbgekew.org.uk/ksheets/microprop.html>>.

SAMOYLOV, V. M.; TUCKER, D. M.; PARROT, W. A. Soybean (*Glicine max* (L.) merril) embryogenic cultures: the role of sucrose and total nitrogen content on proliferation. **In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 34, p. 8-13, 1998.

SARAIVA, E. S. et al. Embriogênese somática em jaboticaba graúda (*Myrciaria grandifolia* Mattos), uma espécie ameaçada de extinção. In: SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTIFICA, 14.; MOSTRA CIENTIFICA DA PÓS-GRADUAÇÃO, 4.; SIMPÓSIO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA, 2., 20 a 23 de outubro, 2004. **Resumos...** [S.l.: s.n.], 2004.

SECRETARIA DE AGRICULTURA, IRRIGAÇÃO E REFORMA AGRÁRIA – SEAGRI.. Cultura – Jaboticaba. 2001. Disponível em: <<http://www.bahia.ba.gov.br/seagri/jaboticaba.htm>>.

SCHULTHEIS, J. R.; CHÉE, R. P.; CANTLIFFE, D. J. Embriões somáticos e semente sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S. (Eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Imprensa Nacional, 1990. p. 433.

SHARP, W. R.; EVANS, D. A.; SONDAHL, M. R. Application of somatic embryogenesis to crop improvement. In: FUJIWARA, A. (Ed.). **Plant tissue culture**. Tokio: Maruzen, 1982. p. 759-762.

SLAWINSKA, J.; OBENDORF, R. L. Soybean somatic embryo maturation: composition, respiration and water relations. **Seed Science Research**, v. 1, p. 251-262, 1991.

SMITH, W. A. **Regulation of plant somatic cell embryo development in vitro**. Riverside: University of California. 1985. 420 f. (Thesis).

SÖNDAHL, M. R.; SPAHLINGER, D. A.; SHARP, W. R. A histological study of high frequency and low frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea Arabica* L. **Z. Pflanzenphysiol.**, v. 94, p. 101-108, 1979.

STASOLLA, C.; YEUNG, E. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryos quality. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, p. 15-35, 2003.

STAMP, J. A. Somatic embryogenesis in cassava: The anatomy and morphology of the regeneration process. **Annal of Botanic**, v. 57, p. 451-459, 1987.

STEINER, N.; VIEIRA, F. N.; GUERRA, M. P. Características histológicas e histoquímicas do desenvolvimento de embriões somáticos de *Araucaria angustifolia*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BOTÂNICA, 54.; REUNIÃO AMAZÔNICA DE BOTÂNICA, 3., 2003, Belém do Pará. **Anais...** Belém, 2003.

STUART, D. A.; NELSEN, J.; NICHOL, J. W. Expression of 7S and 11S alfafa (*Medicago sativa*) seed storage proteins in somatic embryos. **Journal of Plant Physiology**, v. 132, p. 134-139, 1988.

TAYLOR, M. G.; VASIL, L. K. The ultrastructure of somatic embryo development in pearl millet (*Pennisetum glaucum*; Poaceae). **American Journal of Botany**, v. 83, p. 28-44, 1996.

TULECKE, W. Somatic embryogenesis in woody perennials. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (Eds.). **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. v. 2, p. 61-91.

TURNER, S.R. et al. Cryopreservation of shoot tips from six endangered australian species using a modified vitrification protocol. **Annals of Botany**, v. 87, p. 371-378, 2001.

VERDUS, M-C.; DUBOIS, J.; VASSEUR, J. Ultrastructural changes in leaves of *Cichorium* during somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, v. 72, p. 375-383, 1993.

VIDAL, B. C. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. **Cell Mol. Biol.**, v. 22, p. 45-64, 1977.

VON ARNOLD, S. et al. Development pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 233-249, 2002.

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

WATT, M. P. et al. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis*. **South African Forestry Journal**, v. 157, p. 59-65, 1991.

WETZSTEIN, H.Y.; BAKER, C. M. The relationship between somatic embryo morphology and conversion in peanut (*Arachis hypogea* L.). **Plant Science**, v. 92, p. 81-89, 1993.

WILLIAMS, E. G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, v. 57, p. 443-462, 1986.

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