

**PAULA VIDELA RIVERO**

**POLIAMINAS E MORFOGÊNESE EM TECIDOS DE  
*Solanum melongena* L. cv. Embú (Solanaceae)  
CULTIVADOS *in vitro***

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**PAULA VIDELA RIVERO**

**POLIAMINAS E MORFOGÊNESE EM TECIDOS DE  
*Solanum melongena* L. cv. Embú (Solanaceae)  
CULTIVADOS *in vitro***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/  
IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo  
2006

**PAULA VIDELA RIVERO**

**POLIAMINAS E MORFOGÊNESE EM TECIDOS DE  
*Solanum melongena* L. cv. Embú (Solanaceae)  
CULTIVADOS *in vitro***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/  
IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Àrea de concentração: Fisiologia vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Walter Handro.

São Paulo  
2006

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Videla Rivero, Paula.

Poliaminas e morfogênese em tecidos de *Solanum melongena* L. cv Embú cultivados *in vitro* / Paula Videla Rivero. -- São Paulo, 2006.

Orientador: Walter Handro.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Biotecnologia vegetal.

Versão do título para o inglês: Polyamines and morphogenesis in tissues of *Solanum melongena* L. cv. Embú cultured *in vitro*.

Descritores: 1. Poliaminas 2. Organogênese 3. Embriogênese somática 4. Fisiologia vegetal 5. Bioquímica de Plantas 6. Cultura de Tecidos I. Handro, Walter II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

ICB/SBIB0135/2006

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Paula Videla Rivero.

Título da Dissertação: Poliaminas e morfogênese em tecidos de *Solanum melongena*  
L. cv Embú cultivados *in vitro*.

Orientador(a): Walter Handro.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,  
em sessão pública realizada a ...../...../.....,

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:  
Nome:  
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:  
Nome:  
Instituição:

Presidente: Assinatura:  
Nome:  
Instituição:

## **DEDICATÓRIA**

**Aos meus filhos, Daniel e Sebastián**

**Ao meu marido e aos meus pais pelo apoio constante,**

**Com muito amor!**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Laboratório de Biologia Celular de Plantas (Biocel /IB /USP) pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Walter Handro pelo inestimável auxílio, orientação e paciência dispensadas durante o Mestrado.

À Dra. Eny I. S. Floh pelas valiosas contribuições durante a realização deste trabalho.

Aos pesquisadores Dra. Claudete Santa-Catarina e Dr. Vanildo Silveira pela amizade e por todo o apoio na aprendizagem das metodologias e equipamentos usados neste período.

A minha família pelo incentivo, apoio e carinho.

Aos amigos do Laboratório Biocel pelo convívio e amizade.

À Carmen Sílvia Freitas pelo apoio técnico e amizade durante a realização deste trabalho.

Aos amigos, funcionários do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo pela contribuição na realização deste trabalho.

Aos amigos e funcionários da Biblioteca e Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pelo apoio durante este período.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada por tudo!



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-D - ácido 2,4-diclorofenoxiacético  
ANA - ácido naftalenoacético  
AIA - ácido indol-3-acético  
Arg - arginina  
Agm – agmatina  
ADC – arginina descarboxilase  
BAP - 6-benzilaminopurina  
DAH - 1,7-diaminoheptano  
ES – embriogênese somática  
FAO – Food and Agriculture Organization  
HCl – ácido clorídrico  
HPLC – cromatografia líquida de alto desempenho  
MF – massa fresca  
ODC - ornitina descarboxilase  
Orn - ornitina  
OG – organogênese  
PAs – poliaminas  
Put – putrescina  
SAM - S-adenosilmetionina  
Spd - espermidina  
Spm – espermina  
TDZ - tiazuron

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	12
1.1 O controle da morfogênese <i>in vitro</i> .....	12
1.2 Poliaminas (PAs).....	13
1.3 Estudos em berinjela .....	14
1.3.1 Aspectos gerais .....	14
1.3.2 Organogênese (OG).....	15
1.3.3 Embriogênese somática (ES) .....	15
1.3.4 Poliaminas.....	16
1.4 Objetivos .....	16
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	18
2.1 Material vegetal.....	18
2.2 Obtenção de explantes.....	18
2.3 Organogênese.....	19
2.4 Embriogênese somática .....	19
2.5 Dinâmica de crescimento por incremento de massa fresca (MF) e morfologia .....	20
2.6 Efeito de vitaminas e aminoácidos na OG .....	20
2.7 Efeito de PAs exógenas no conteúdo de PAs endógenas e nas respostas morfogênicas em explantes de cotilédones .....	21
2.7.1 Organogênese.....	21
2.7.2 Embriogênese somática .....	21
2.8 Cultivo <i>in vitro</i> .....	22
2.9 Determinação de poliaminas .....	22
2.10 Delineamento experimental e análise estatística dos dados.....	23
3 RESULTADOS .....	25
3.1 Padrões morfogênicos e crescimento dos explantes cultivados <i>in vitro</i> .....	25
3.1.1 Embriogênese somática .....	25
3.1.2 Organogênese.....	27

3.2 Padrão e conteúdo de PAs.....	31
3.2.1 Padrão e conteúdo inicial nos explantes.....	31
3.2.2 Variação no conteúdo de PAs durante os processos morfogênicos.....	32
3.2.2.1 <i>Embriogênese somática</i> .....	32
3.2.2.2 <i>Culturas organogênicas</i> .....	36
3.2.2.2.1 <i>Explantes de cotilédones</i> .....	37
3.2.2.2.2 <i>Explantes de hipocótilos</i> .....	41
3.3 Efeito de vitaminas e aminoácidos na morfogênese de explantes cotiledonares e conteúdo de PAs .....	47
3.3.1 Padrão morfogênético .....	47
3.3.2 Padrão e conteúdo de PAs.....	47
3.4 Efeito de PAs exógenas no conteúdo de PAs endógenas e nas respostas morfogênicas em explantes de cotilédones .....	54
3.4.1 Organogênese.....	54
3.4.1.1 <i>Padrão morfogênético</i> .....	54
3.4.1.2 <i>Padrão e conteúdo de PAs</i> .....	55
3.4.2 Embriogênese somática .....	60
3.4.2.1 <i>Padrão morfogênético</i> .....	60
3.4.2.2 <i>Padrão e conteúdo de PAs</i> .....	62
4 Discussão.....	67
4.1 O papel do tipo e região do explante, e do meio de cultura nas respostas morfogênicas	67
4.2 Conteúdo e variação de poliaminas em explantes e culturas .....	68
4.3 Efeito da aplicação de PAs exógenas nas respostas morfogênicas e no teor endógeno.	75
4.4 Considerações finais e perspectivas .....	77
REFERÊNCIAS.....	79

## RESUMO

Videla Rivero P. Poliaminas e morfogênese em tecidos de *Solanum melongena* L. cv. Embú cultivados *in vitro* [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2006.

A embriogênese somática (ES) e a organogênese (OG) são as vias mais importantes para a regeneração de plantas *in vitro*, podendo ser utilizadas como modelos para investigar a morfogênese. O objetivo deste trabalho foi correlacionar estes dois processos morfogenéticos, em diferentes tecidos de *Solanum melongena*, com a variação do conteúdo de poliaminas (PAs) endógenas. Para isso, verificou-se o efeito dos fitorreguladores ácido indol-3-acético (AIA), 6-benzilaminopurina (BAP), tidiazuron (TDZ) e ácido naftalenoacético (ANA), na determinação do tipo de rota morfogenética e no crescimento, em tecidos de cotilédones e hipocótilos. Foram determinados também os efeitos de vitaminas e aminoácidos na morfogênese de explantes de cotilédones, e no conteúdo de PAs endógenas durante a OG. Foram determinados ainda os efeitos de PAs exógenas no conteúdo de PAs endógenas e nas respostas morfogenéticas ocorridas em condições embriogênicas e organogênicas, a partir de explantes de cotilédones. Dentre os resultados obtidos ressalta-se que: 1) ocorrem diferenças no potencial organogenético e embriogenético, nos vários tecidos e em suas diferentes regiões, sob influência dos diferentes fitorreguladores. Ao suplementar-se o meio de cultivo com ANA, os cotilédones mostraram uma maior competência para ES quando comparados aos hipocótilos. Entretanto, ao suplementar-se o meio com AIA e BAP ou AIA, BAP e TDZ, o potencial organogenético dos cotilédones foi menor de que aquele observado nos hipocótilos; 2) os altos conteúdos endógenos iniciais de putrescina (Put) e espermidina (Spd) nas formas livre e conjugada, observados nos cotilédones, foram correlacionados com a competência para ES. Os baixos níveis de PAs nas formas livre e conjugada, observados nos hipocótilos, foram associados com uma maior capacidade organogenética. Adicionalmente, foi possível associar aos processos de ES e OG nos diferentes tecidos, e nas suas diferentes regiões, um padrão de variação característico dos teores endógenos de PAs; 3) independentemente do processo morfogenético, verificou-se que dentre as PAs na forma livre, a Spd foi a PA mais abundante, enquanto que na forma conjugada, foi a Put mais abundante. Esta última foi a PA que mais aumentou seu conteúdo ao longo dos cultivos. Analisando-se um possível efeito das vitaminas e aminoácidos adicionados ao meio básico organogênico, verificou-se diferenças principalmente em relação ao acúmulo das PAs conjugadas, apesar da semelhança na evolução organogênica dos cotilédones; 4) os explantes cultivados em meio suplementado com as vitaminas e aminoácidos do meio MS mostraram, em relação àqueles cultivados com as

vitaminas e aminoácidos do meio B<sub>5</sub>, um maior conteúdo das PAs conjugadas, especialmente quando foram visualizadas as primeiras estruturas morfogênicas; 5) a adição de PAs exógenas nas culturas de explantes de cotilédono, submetidos aos programas de ES e OG, mostrou que a alteração das PAs endógenas estava relacionada ao processo morfogenético.

Palavras-chave: embriogênese somática, fitorreguladores, *Solanum melongena*, organogênese, poliaminas.

## ABSTRACT

Videla Rivero P. Polyamines and morphogenesis in tissues of *Solanum melongena* L. cv. Embú cultured *in vitro* [MSc thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2006.

Somatic embryogenesis (SE) and organogenesis (OG) are the most important pathways for plant regeneration, capable of being used as models to investigate *in vitro* morphogenesis. The aim of this work was to correlate these two morphogenetic processes, in different tissues of *Solanum melongena*, with variation of the endogenous contents of polyamines (PAs). For this, the effect of the growth regulators indole-3-acetic acid (IAA), 6-benzylaminopurine (BAP), thidiazuron (TDZ) and naphthalene acetic acid (NAA), in the determination of the growth and type of morphogenetic route was verified, in tissues of cotyledons and hypocotyls. The effects of vitamins and amino acids in the morphogenesis of cotyledons explants, and in the endogenous PAs content during the OG were also studied. Furthermore, the effect of exogenous PAs in the content of endogenous PAs and in the morphogenetic responses from explants of cotyledons had already been fixed. Among achieved results, these outstanding are: 1) differences occur in the organogenic and embryogenic potential, both in cotyledons and hypocotyls and in their different regions, depending on the growth regulators balance. When the culture medium was supplemented with NAA, cotyledons showed higher ability for SE when compared with hypocotyls. However, when the medium was supplemented with IAA and BAP or IAA, BAP and TDZ, the organogenic potential of cotyledons was lower than that observed in hypocotyls; 2) the high initial endogenous contents of putrescine (Put) and spermidine (Spd) in the free and conjugated forms observed in cotyledons was correlated with ES ability. The low levels of PAs in the free and conjugated forms observed in hypocotyls, was associated with a higher organogenic capacity. In addition, it was possible to associate to the ES and OG processes in the different tissues and their different regions, a characteristic variation pattern of endogenous levels of PAs; 3) independent of the morphogenetic process, it was verified that amongst the PAs in the free form, Spd was the most abundant PA, whereas in the conjugated form was Put. The latter was the PA that increased its content the most amongst all the cultures. Analyzing a possible effect of vitamins and amino-acids added to the organogenic basic medium, differences were mainly noted in relation to the accumulation of conjugated PAs, apart from the similarity in organogenic evolution of cotyledons; 4) the explants cultivated in a medium supplemented with vitamins and amino acids of the MS medium showed, in relation to those cultivated with vitamins and amino acids of the B<sub>5</sub> medium, a higher content of conjugated PAs, especially when the former morphogenic structures were taken into account; 5) the addition of

exogenous PAs in the submitted explants of cotyledon to SE and OG programs, mainly indicated an endogenous alteration of the PAs related to the morphogenetic process.

Key words: *Solanum melongena*, organogenesis, phytohormones, polyamines, somatic embryogenesis.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O controle da morfogênese *in vitro*

A morfogênese nas plantas é consequência da integração dos processos de divisão e diferenciação celular, os quais conduzem a uma estrutura organizada característica (Handro e Floh, 1990). Tais processos são controlados por uma variedade de sinais internos ou do ambiente, tais como os hormônios e a luz, capazes de modificar o crescimento e o desenvolvimento. Nos tecidos vegetais em cultura, modificações na composição de fitorreguladores e sua interação com o meio nutritivo tem sido a estratégia básica para manipular a morfogênese *in vitro* (Sahrawat e Chand 2001). Os padrões morfogenéticos mais comuns que ocorrem em tecidos cultivados *in vitro* são: a) a neoformação de raízes e gemas caulinares, vegetativas ou florais, através da organogênese (OG), que pode ser ainda direta, ou indireta, a partir de um calo; b) embriogênese somática (ES). Estas são as mais importantes vias de regeneração de plantas *in vitro*.

A formação de calo é uma das respostas mais comuns de um tecido cultivado *in vitro*. Muitas vezes, no explante cultivado *in vitro*, não ocorre a formação de calos, mas apenas uma proliferação celular restrita às regiões seccionadas do explante, com formação de tecidos de cicatrização e zonas de intensa atividade meristemática, que levará à formação de um meristema e a um órgão bem definido, constituindo-se no processo denominado OG direta (Handro, Floh, 1990). Nesse processo morfogenético formam-se gemas caulinares ou raízes, em resposta às condições apropriadas de cultura, principalmente tipo e concentração de fitorreguladores presente no meio.

A ES é um processo análogo a embriogênese zigótica, no qual uma célula ou um pequeno grupo de células são os precursores dos embriões somáticos (Von Arnold et al., 2002). Em condições *in vitro*, a ES ocorre em explantes cujas células são determinadas ou pré-embriogênicas (Sharp et al., 1980), ou então o processo começa com uma fase inicial na qual as células se desdiferenciam e tornam-se, posteriormente, competentes para embriogênese (De Jong et al., 1993). As condições para estimular a ES são, principalmente, hormonais (Von Arnold et al., 2002), mas também condições de estresse, concentrações inadequadas de sais, metais pesados e antibióticos, entre outras. Nas dicotiledôneas, os estágios embriogênicos, similares na ontogenia, sejam somáticos ou zigóticos, são: globular, coração, torpedo e cotiledonar.

O emprego da ES pode ter diferentes objetivos, que vão desde a obtenção de um modelo de referência para estudos básicos em fisiologia e bioquímica, até a propagação clonal, visando a conservação e o melhoramento genético das espécies. Comparativamente às



demais técnicas de micropropagação, a ES apresenta as seguintes vantagens: a) permite a obtenção de uma grande quantidade de propágulos (embriões somáticos); b) o sistema permite um alto grau de automatização, permitindo baixar os custos por unidade produzida; c) os embriões somáticos podem ser produzidos de forma sincronizada, com alto grau de uniformização e pureza genética; d) pode ser utilizada como uma ferramenta integrada a programas de melhoramento vegetal (Högberg et al., 1998; Guerra et al., 1999).

As respostas morfogênicas obtidas *in vitro* podem variar devido a diferenças do meio basal, dos fitorreguladores usados e do genótipo (Sharma e Rajam, 1995a; Shoeb et al., 2001). Dentre os fitorreguladores, o balanço entre auxinas e citocininas, como foi demonstrado por Skoog e Miller (1957), é fundamental para o processo de OG *in vitro*. As auxinas e citocininas interagem no controle de vários processos de desenvolvimento, particularmente na dominância apical e no desenvolvimento de raízes e gemas (Nordström et al., 2004). O efeito das auxinas exógenas sobre os vários eventos morfogênicos está relacionado ao tipo empregado. Assim, por exemplo, o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é um fator condicionante da indução de embriões somáticos, provavelmente associado com um aumento da metilação do DNA (Lo Schiavo et al., 1990), enquanto que o posterior desenvolvimento dos estágios embriogênicos é geralmente inibido ou interrompido por auxinas (Jimenez, 2001). Menos freqüente é o uso de citocininas para indução da ES, sendo a 6-benzilaminopurina (BAP) a mais utilizada. Outro fitorregulador que se mostra muito efetivo para induzir regeneração de gemas *in vitro* é o tidiazuron (TDZ), uma feniluréia com alta atividade citocinínica (Fiola et al., 1990; Magioli et al., 1998; Murthy et al., 1998), em diferentes explantes de várias espécies, tais como berinjela (Sharma e Rajam, 1995a; Magioli, 1998), ervilha (Bohmer et al., 1995) e feijão-mungo (Amutha et al., 2006).

## 1.2 Poliaminas (PAs)

As PAs são aminas alifáticas com carga positiva em pH neutro, presentes em todas as células vegetais e com um papel importante na estabilização de membranas, proteínas e ácidos nucléicos (Kakkar et al., 2000; Kakkar e Sawhney, 2002), sendo as mais abundantes a putrescina (Put), a espermidina (Spd) e a espermina (Spm). A Put é formada diretamente a partir da descarboxilação da ornitina (Orn) pela enzima ornitina descarboxilase, ou por descarboxilação da arginina (Arg) pela enzima arginina descarboxilase (ADC), formando a agmatina (Agm), que é convertida então a Put. A Spd e Spm são formadas a partir da Put, e requerem a adição de grupos aminopropil provenientes da descarboxilação da S-adenosilmetionina (SAM) (Bouchereau et al., 1999; Kakkar et al., 2000).

As PAs tem sido descritas como uma nova classe de fitorreguladores ou como mensageiros secundários destas substâncias, mostrando um papel importante na modulação

de vários processos fisiológicos que vão desde o crescimento e diferenciação celular, incluindo a ES e a OG, até respostas ao estresse (Bais e Ravishankar, 2002; Kakkar e Sawhney, 2002). Nas plantas, as PAs ocorrem na forma solúvel, como bases livres ou conjugadas, associadas com moléculas pequenas, tais como ácidos fenólicos, e também na forma insolúvel, ligada a várias macromoléculas, como proteínas (Martin-Tanguy, 2001; Papadakis et al., 2005).

O papel das PAs e seu envolvimento em processos morfogênicos tem sido estudado principalmente através do uso de inibidores de sua biossíntese, aplicação de PAs exógenas, e por correlação temporal e espacial da variação nos conteúdos destas substâncias associada com as diferentes fases da morfogênese. Diversos estudos tem avaliado explantes diferentes da mesma espécie (Altamura et al., 1993; Sharma et al., 1995a, b; Paschalidis e Roubelakis-Angelakis, 2005), ou tecidos diferentes do mesmo explante (Pedroso et al., 1997). As PAs tem mostrado interagir com fitorreguladores, como as auxinas e citocininas (Legocka e Zarnowska, 1999; Biondi et al., 2003), deixando ainda mais claro a importância das PAs e da existência de um grau de associação com os processos de desenvolvimento como, por exemplo, a morfogênese *in vitro*. Neste sentido, o estudo das PAs vem sendo utilizado para otimizar os processos de desenvolvimento das plantas, tais como a ES, em culturas de importância agrônômica, e para esclarecer os eventos regulatórios da morfogênese *in vitro* (Kakkar et al., 2000; Shoeb et al., 2001). Os níveis de PAs e razão de Put/(Spd+Spm) nas plantas foram correlacionados em vários sistemas à capacidade morfogênica *in vitro*, sugerindo-se que possam ser utilizados como marcadores e possíveis moduladores da habilidade de regeneração (Shoeb et al., 2001).

### **1.3 Estudos em berinjela**

#### **1.3.1 Aspectos gerais**

A berinjela (*S. melongena*) é uma hortaliça importante economicamente em várias regiões de clima tropical e subtropical. Em 2004, por exemplo, 1,7 milhões de hectares foram cultivados no mundo todo, com uma produção total de 29,9 milhões de toneladas, das quais 92,4% foram produzidas na Ásia (FAO, 2005).

Em cultivo *in vitro*, diversos tipos de explantes como folhas, cotilédones e hipocótilo mostram regeneração através dos sistemas de ES e OG, utilizando-se variadas metodologias de cultivo, em um curto período de tempo (Collonnier et al., 2001; Kantharajah e Golegaonkak, 2004; Magioli e Mansur, 2005). Assim, a berinjela proporciona um sistema promissor para estudos básicos, principalmente aqueles referentes à fisiologia e à bioquímica, durante o crescimento e diferenciação *in vitro*, visando um melhor entendimento dos processos de morfogênese.

### 1.3.2 Organogênese (OG)

A OG *in vitro* tem sido estudada com êxito tanto em variedades cultivadas, quanto nas selvagens, assim como em híbridos (Kashyap et al., 2003). As citocininas BAP, cinetina e zeatina induzem a regeneração de gemas a partir de explantes de folha (Allichó et al., 1982; Gleddie et al., 1983; Mukherjee et al., 1991). Sharma e Rajam (1995a) demonstraram que a combinação de BAP (11,1  $\mu\text{M}$ ) e AIA (2,9  $\mu\text{M}$ ) é ideal para a regeneração de gemas, sendo que os explantes de hipocótilos são mais competentes que os de folhas e cotilédones para este tipo de resposta. Estes autores também observaram a existência de diferenças no potencial morfogênético dentro de um mesmo explante. Assim, a região basal do hipocótilo tem maior capacidade organogenética que a região apical, mostrando um gradiente basípeto. O uso do TDZ resultou numa eficiente regeneração de gemas, sendo que explantes de folhas e cotilédones apresentaram melhor resposta (Magioli et al., 1998).

### 1.3.3 Embriogênese somática (ES)

A produção de embriões somáticos em *S. melongena* já foi registrada a partir de diferentes explantes, como hipocótilo, cotilédones, folha, caule, raízes, suspensões celulares e protoplastos (Matsuoka e Hinata, 1979; Gleddie et al., 1983; Fobert e Webb, 1988; Kalloo, 1993; Sharma e Rajam, 1995 a,b; Yadav e Rajam, 1997,1998).

Yadav e Rajam (1998) definiram quatro estágios críticos para ocorrência de ES a partir de explantes foliares de berinjela. Estes estágios incluem: a) a indução de calo; b) a aquisição de competência celular embriogênica com formação de setores proembriogênicos; c) a expressão da embriogênese, na qual agrupamentos proembriogênicos se desenvolvem em embriões globulares visíveis como pontuações verdes; d) desenvolvimento e maturação de embriões somáticos.

A regeneração de embriões somáticos a partir de embriões zigóticos tem sido obtida, nesta espécie, em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com AIA (Yamada et al., 1967 *apud* Kashyap et al., 2003), enquanto os explantes foliares necessitam de um meio suplementado com ácido naftalenoacético (ANA) (2-6  $\text{mg.L}^{-1}$ ) (Gleddie et al., 1983; Sharma e Rajam, 1995a). A concentração de ANA necessária para aumentar a diferenciação de embriões somáticos a partir de hipocótilos é bem maior (6-10  $\text{mg.L}^{-1}$ ), enquanto uma concentração menor (0,016  $\text{mg.L}^{-1}$ ) induz calogênese e rizogênese neste mesmo tipo de explante (Matsuoka e Hinata, 1979).

### 1.3.4 Poliaminas

As PAs tem sido estudadas em relação a OG e ES em vários sistemas vegetais (Minocha e Minocha, 1995). Particularmente, o processo de ES é uma via importante de regeneração e um modelo potencial para o estudo dos eventos que regulam a morfogênese *in vitro*. Em berinjela, explantes cotiledonares tratados com ANA, indutor da ES, apresentaram altos níveis de Put e Spd livres em comparação com aqueles sem este regulador (Fobert e Webb, 1988). Para explantes de diferentes regiões de folhas e hipocótilo, foi observada uma correlação positiva entre a capacidade embriogênica destes e a distribuição espacial das PAs livres e conjugadas (Sharma e Rajam, 1995b; Yadav e Rajam, 1997 e 1998). Yadav e Rajam (1998) demonstraram que através de um ajuste temporal no conteúdo celular de PAs era possível uma regulação da resposta embriogênica a partir de explantes de folhas.

Estudos de PAs em berinjela relacionados a outras rotas morfogenéticas são menos freqüentes. A OG a partir de explantes cotiledonares, induzida por fitorreguladores, está associada a um aumento da biossíntese de PAs e a sua conjugação (Scoccianti et al., 2000). Sharma et al. (1997) demonstraram que as PAs, particularmente a Spd, estão envolvidas de forma complexa no crescimento e diferenciação de raízes. Algumas destas investigações tem comparado os níveis de PAs de explantes da mesma espécie que apresentam regeneração ou não (Aribaud et al., 1994; Scoccianti et al., 2000), ou ainda de explantes que apresentam regeneração sem a presença de fitorreguladores (Sharma et al., 1997).

### 1.4 Objetivos

Neste contexto, no presente trabalho objetivou-se estudar as PAs em relação a duas vias morfogenéticas (ES e OG), a partir de diferentes tecidos de *S. melongena* cv. Embú, visando entender melhor o papel das PAs durante a morfogênese *in vitro*. Para isso, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

-Verificar o efeito de diferentes fitorreguladores na determinação de rotas morfogenéticas em tecidos de cotilédones e hipocótilos de *S. melongena* cv. Embú.

-Estudar a variação dos teores endógenos de PAs em tecidos nas diferentes rotas morfogenéticas:

- Determinar a variação dos conteúdos de PAs ocorrida durante a ES, nas fases de indução e regeneração, obtida a partir de explantes cotiledonares.
- Determinar a variação dos conteúdos de PAs ocorrida durante a OG, obtida a partir de cotilédones e hipocótilos.

-Estudar o efeito de vitaminas e aminoácidos na morfogênese de explantes de cotilédones, e no conteúdo de PAs endógenas durante a OG.

-Estudar o efeito de PAs exógenas no conteúdo de PAs endógenas e nas respostas morfogênicas, ocorridos em condições embriogênicas e organogênicas, a partir de explantes de cotilédones.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal

Foram utilizadas plântulas de 21 dias obtidas a partir da germinação de sementes de *S. melongena*, cv. Embú, (Agroflora®). Para a obtenção de plântulas, sementes de *S. melongena* foram esterilizadas superficialmente por imersão durante 20 minutos em solução aquosa de hipoclorito de sódio 0,6 % (v/v) adicionada de três gotas de Tween 20 por 100 mL de solução, e enxaguadas, quatro vezes, com água autoclavada. As sementes foram inoculadas, em câmara de fluxo laminar, em frascos 'wheaton' (12 por frasco) contendo 100 mL de meio MS (Murashige e Skoog, 1962) contendo sacarose (20 g.L<sup>-1</sup>) e geleificados pela adição de agar (7 g.L<sup>-1</sup>) (Sigma®). O pH do meio foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem a 121 °C (1,2 kg.cm<sup>-2</sup>) por 15 minutos. Após a germinação, as plântulas foram mantidas nos frascos por 15 dias, quando foram utilizadas para obtenção dos explantes, totalizando 21 dias de cultivo.

### 2.2 Obtenção de explantes

A partir das plântulas foram obtidos explantes cotiledonares (1-1,5 cm de comprimento) da região distal (a) e proximal (b), e explantes de hipocótilo (4-5 cm de comprimento), provenientes da região distal (c) e proximal (d), que foram utilizados nos experimentos *in vitro* (Figura 1).

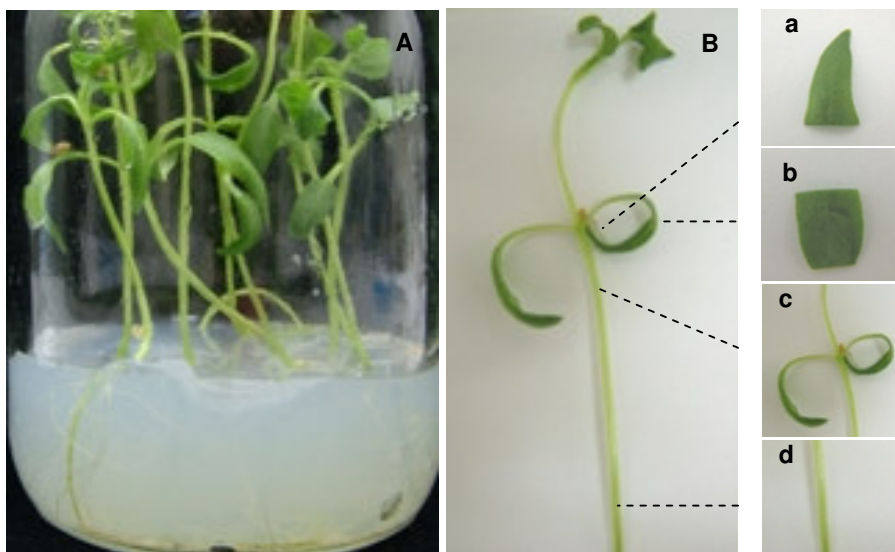


Figura 1. Fonte de explantes. A – Plântulas de *S. melongena* germinadas *in vitro*, com 21 dias de cultivo. B – Plântula mostrando os locais de origem dos explantes.

## 2.3 Organogênese

Explantos de hipocótilos e cotilédones obtidos das plântulas foram inoculados em frascos 'wheaton' contendo 30 mL de meio composto dos sais MS e vitaminas B<sub>5</sub> (Gamborg et al., 1968), e suplementado com sacarose (20 g.L<sup>-1</sup>). A este meio básico, denominado MB, foram adicionados diferentes fitorreguladores constituindo os seguintes tratamentos:

- Tratamento controle: MB, sem fitorreguladores.
- Tratamento AIA+BAP: MB suplementado com 2,9 µM de AIA e 11,1 µM de BAP.
- Tratamento AIA+BAP+TDZ: MB suplementado com 2,9 µM de AIA, 11,1 µM de BAP e 0,2 µM de TDZ.

O pH dos meios foi ajustado para 5,7, e adicionado com 7 g.L<sup>-1</sup> de agar antes da autoclavagem a 121 °C, por 15 minutos. Os fitorreguladores AIA e BAP foram adicionados ao meio antes da autoclavagem, enquanto o TDZ foi filtro-esterilizado e adicionado ao meio de cultura posteriormente, com temperatura de ± 40 °C. Cada tratamento constou de cinco frascos, sendo colocados em cada frasco três explantes idênticos. Foram coletadas amostras de 200 mg de massa fresca (MF), para a determinação de PAs, e as avaliações de crescimento e morfogênese, a partir dos explantes originais, antes da inoculação, e após 7, 13, 19 e 25 dias de cultivo, congeladas em nitrogênio líquido, e armazenadas a - 20 °C para posterior análise de PAs.

## 2.4 Embriogênese somática

Para a obtenção de um sistema de ES e determinação do efeito da duração da fase de indução no desenvolvimento dos embriões, explantes cotiledonares e de hipocótilos, das regiões proximal e distal, foram inoculados, separadamente, em frascos 'wheaton' contendo 30 mL de meio MS suplementado com sacarose (20 g.L<sup>-1</sup>). A este meio, denominado MS, foram adicionados fitorreguladores, constituindo os seguintes tratamentos:

- Tratamento controle: MS sem suplementação de fitorreguladores, onde os explantes foram mantidos por 14 dias.
- Tratamento ANA: MS suplementado com 26,85 µM de ANA, onde os explantes foram mantidos por 35 dias.
- Tratamento ANA (14d): MS suplementado com 26,85 µM de ANA, onde os explantes foram mantidos durante 14 dias e, em seguida, transferidos para o meio básico MS sem fitorreguladores, permanecendo por mais 21 dias de cultura.

O pH do meio foi ajustado para 5,7 e geleificado pela adição de agar (7 g.L<sup>-1</sup>) antes da autoclavagem, a 121 °C por 15 minutos. Cada tratamento constou de cinco frascos com três explantes idênticos. As coletas de amostras para determinação de PAs e as avaliações do

crescimento e morfogênese foram realizadas nos explantes originais, antes da inoculação, e após 14, 21, 24, 26 e 35 dias de cultivo. Amostras de 200 mg de MF foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior análise de PAs.

## 2.5 Dinâmica de crescimento por incremento de massa fresca (MF) e morfologia

A MF (g) foi determinada pela média de cinco amostras, cada uma representada pelo conteúdo de um frasco, ao longo das coletas dos experimento de OG e ES. As culturas também foram fotografadas e comparadas quanto a sua evolução morfogenética durante o cultivo.

## 2.6 Efeito de vitaminas e aminoácidos na OG

Explantos de cotilédones foram inoculados em frascos 'wheaton' contendo 30 ml de meio composto dos sais MS e suplementado com sacarose ( $20\text{ g.L}^{-1}$ ), ao qual foram adicionados  $2,9\ \mu\text{M}$  AIA e  $11,1\ \mu\text{M}$  de BAP. Foram feitos dois tratamentos, um onde o meio foi suplementado com as vitaminas e aminoácidos do meio MS (denominado MS) e outro no qual foram adicionados as vitaminas e aminoácidos do meio B<sub>5</sub> (denominado MB) (Tabela 1).

O pH dos meios foi ajustado para 5,7 acrescentando-se  $7\text{ g.L}^{-1}$  de agar antes da autoclavagem a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Os fitorreguladores AIA e BAP foram adicionados ao meio antes de autoclavagem. Cada tratamento constou de cinco frascos, sendo colocados em cada um deles três explantes idênticos. As análises de PAs foram realizadas a partir de amostras (200 mg de MF) coletadas dos explantes originais, antes da inoculação, e de cada tratamento aos 7, 13, 21, 28 dias de cultura, depois de congeladas e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Tabela 1. Comparação na composição de vitaminas e aminoácidos dos meios MS e B<sub>5</sub> para indução da morfogênese em explantes de cotilédones de *S. melongena*.

<b>Vitaminas e aminoácidos</b>		
<b>Concentrações dos Componentes</b>		
	<b>Meio MS</b>	<b>Meio B<sub>5</sub></b>
	<b>(denominado MS)</b>	<b>(denominado MB)</b>
	<b>(mg.l<sup>-1</sup>)</b>	<b>(mg.l<sup>-1</sup>)</b>
Ácido nicotínico	0,5	1,0
Piridoxina.HCl	0,5	1,0
Tiamina.HCl	0,1	10
Glicina	2,0	-



Visando a obtenção de neoformações organogênicas, induzidas através da suplementação dos meios MB e MS com 2,9  $\mu\text{M}$  AIA e 11,1  $\mu\text{M}$  de BAP, após 28 dias de cultivo, os explantes foram transferidos para meio MS meia força acrescido de sacarose (30  $\text{g.L}^{-1}$ ), sem a adição de fitorreguladores. O pH dos meios foi ajustado para 5,7, sendo adicionado 7  $\text{g.L}^{-1}$  de agar antes da autoclavagem a 121  $^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Foram realizadas quatro repetições com três explantes cada, avaliando-se o número de explantes com brotações.

## **2.7 Efeito de PAs exógenas no conteúdo de PAs endógenas e nas respostas morfológicas em explantes de cotilédones**

### **2.7.1 Organogênese**

Explantes de cotilédones obtidos das plântulas foram inoculados em frascos 'wheaton' contendo 30 ml de meio MS, suplementado com sacarose (20  $\text{g.L}^{-1}$ ), e 2,9  $\mu\text{M}$  de AIA e 11,1  $\mu\text{M}$  de BAP. Este meio básico, denominado MS, foi utilizado para o experimento.

O experimento foi composto por quatro tratamentos, onde o meio MS foi suplementado com Put (1,0 mM), Spd (1,0 mM) e Spm (1,0 mM). O meio MS sem suplementação de PA exógena foi utilizado como controle. O pH do meio MS foi ajustado para 5,7 e adicionado com 7  $\text{g.L}^{-1}$  de agar antes da autoclavagem a 121  $^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Os fitorreguladores AIA e BAP foram adicionados ao meio MS antes de autoclavagem. As soluções de Put, Spd e Spm tiveram pH corrigido para  $\text{pH } 5,7 \pm 0,1$  e foram filtro-esterilizadas antes de serem adicionadas ao meio MS já autoclavado, após resfriamento à temperatura de aproximadamente 40  $^{\circ}\text{C}$ . Cada tratamento constou de cinco frascos, sendo colocados em cada um deles três explantes idênticos.

As análises de PAs foram realizadas a partir de amostras (200 mg de MF) coletadas dos explantes originais, antes da inoculação, e de cada tratamento aos 7, 21, 28 dias de cultura, congeladas e armazenadas a -20  $^{\circ}\text{C}$ . As culturas também foram fotografadas e comparadas em relação a sua morfologia após 28 dias de cultivo *in vitro*.

### **2.7.2 Embriogênese somática**

Explantes de cotilédones obtidos das plântulas foram inoculados em frascos 'wheaton' contendo 30 ml de meio MS, suplementado com sacarose (20  $\text{g.L}^{-1}$ ) e, 26,85  $\mu\text{M}$  de ANA. A este meio, denominado MS, foi ajustado o pH para 5,7 e adicionado com 7  $\text{g.L}^{-1}$  de agar antes da autoclavagem a 121  $^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos.

O experimento foi composto por quatro tratamentos, em que o meio MS foi suplementado com Put (1,0 mM), Spd (1,0 mM) e Spm (1,0 mM), sendo um sem suplementação de PA exógena (controle). O fitorregulador ANA foi adicionado ao meio MS antes de autoclavagem, enquanto as soluções de Put, Spd e Spm tiveram pH corrigido para  $5,7 \pm 0,1$ , e foram filtro-esterilizadas antes de serem adicionadas ao meio MS após autoclavagem. Cada tratamento constou de cinco frascos, sendo colocados em cada um deles três explantes idênticos.

As análises de PAs foram realizadas a partir de amostras (200 mg de MF) coletadas dos explantes originais, antes da inoculação, e de cada tratamento aos 7, 21, 28 dias de cultura, depois congeladas e armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . As culturas foram comparadas quanto a sua morfologia, aos 28 dias de cultivo, e em relação ao número total de embriões visualizados em cada explante, determinado pela média de cinco amostras, cada uma representada pelo conteúdo de um frasco, após 35 dias de cultivo.

## **2.8 Cultivo *in vitro***

As culturas para a obtenção de plântulas assim como para os experimentos de OG e ES foram mantidas em temperatura de  $27 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , no período de luz, e  $25 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  no período de escuro. A irradiância foi de  $35\text{ }\mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo branca fria (Philips), com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro.

## **2.9 Determinação de poliaminas**

As PAs livres e conjugadas solúveis em ácido perclórico, foram determinadas de acordo com a metodologia descrita por Silveira et al. (2004). Amostras de 200 mg de MF foram maceradas com 1,6 mL de ácido perclórico 5 % (v/v) e mantidas no gelo por uma hora, sendo posteriormente centrifugadas a 20.000 g por 20 minutos, a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O sedimento foi então ressuspenso em 200  $\mu\text{L}$  de ácido perclórico 5 %, centrifugado novamente e os dois sobrenadantes foram homogeneizados. A fração sobrenadante contém as PAs livres e conjugadas solúveis em ácido perclórico. As PAs conjugadas foram extraídas por hidrólise ácida, utilizando-se 200  $\mu\text{L}$  do sobrenadante em igual volume de HCl 12 N, por 18 horas a  $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, as amostras foram secas a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  sob jato de nitrogênio e ressuspendidas em 200  $\mu\text{L}$  de ácido perclórico 5 %.

As PAs livres e conjugadas foram em seguida derivatizadas. Na derivatização, 40  $\mu\text{L}$  da amostra contendo PAs foram misturados com 100  $\mu\text{L}$  de cloreto de dansil ( $5\text{mg.mL}^{-1}$  em acetona), 50  $\mu\text{L}$  de solução saturada de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) e 20  $\mu\text{L}$  de 1,7-

diaminoheptano (DAH), que foi utilizado como padrão interno. Após a mistura, as amostras foram incubadas no escuro por 50 minutos, a 70 °C. O excesso de cloreto de dansil foi convertido em dansil-prolina, adicionando-se 25 µL de prolina (100 mg.mL<sup>-1</sup>) com posterior incubação por 30 minutos no escuro, a temperatura ambiente. Em seguida, as PAs derivatizadas foram particionadas com 200 µL de tolueno. A fase apolar (tolueno) contendo as PAs foi coletada (175 µL), seca sob jato de nitrogênio e ressuspensa em 175 µL acetonitrila pura.

A identificação e quantificação das PAs foram realizadas por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), com coluna C18 de fase reversa (Shimadzu Shim-pack CLC ODS). Acetonitrila absoluta e acetonitrila 10 % em água, com pH 3,5 ajustado com HCL 1 N, foram utilizadas como solventes. A mudança na proporção de acetonitrila absoluta em relação a acetonitrila 10 % definiu o gradiente de corrida. O gradiente de acetonitrila absoluta foi ajustado para 65%, durante os primeiros 10 minutos; de 65 a 100 %, entre 10 e 13 minutos; e 100 % até 22 minutos, com fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>, a 40 °C. O detector de fluorescência foi ajustado para excitação a 340 nm e emissão a 510 nm. Foram injetados 20 µL da solução derivatizada com cloreto de dansil. As áreas e tempos de retenção de cada PA foram avaliados por comparação com as PAs com concentrações conhecidas: Put, Spd, Spm e DAH.

## **2.10 Delineamento experimental e análise estatística dos dados**

A estratégia delineada para o estudo das PAs foi realizada através da comparação dos conteúdos endógenos iniciais, obtidos a partir dos explantes cotiledonares e de hipocótilos, e dos conteúdos nas diferentes rotas morfogenéticas durante a morfogênese *in vitro*. Numa segunda etapa, foi caracterizado o efeito da aplicação de PAs exógenas no conteúdo de PAs endógenas e nas respostas morfogenéticas, ocorridos em condições embriogênicas e organogênicas, a partir de explantes de cotilédone (Figura 2).

Os dados obtidos foram analisados através das médias e respectivos desvios padrão (Sokal e Rohlf, 1995).

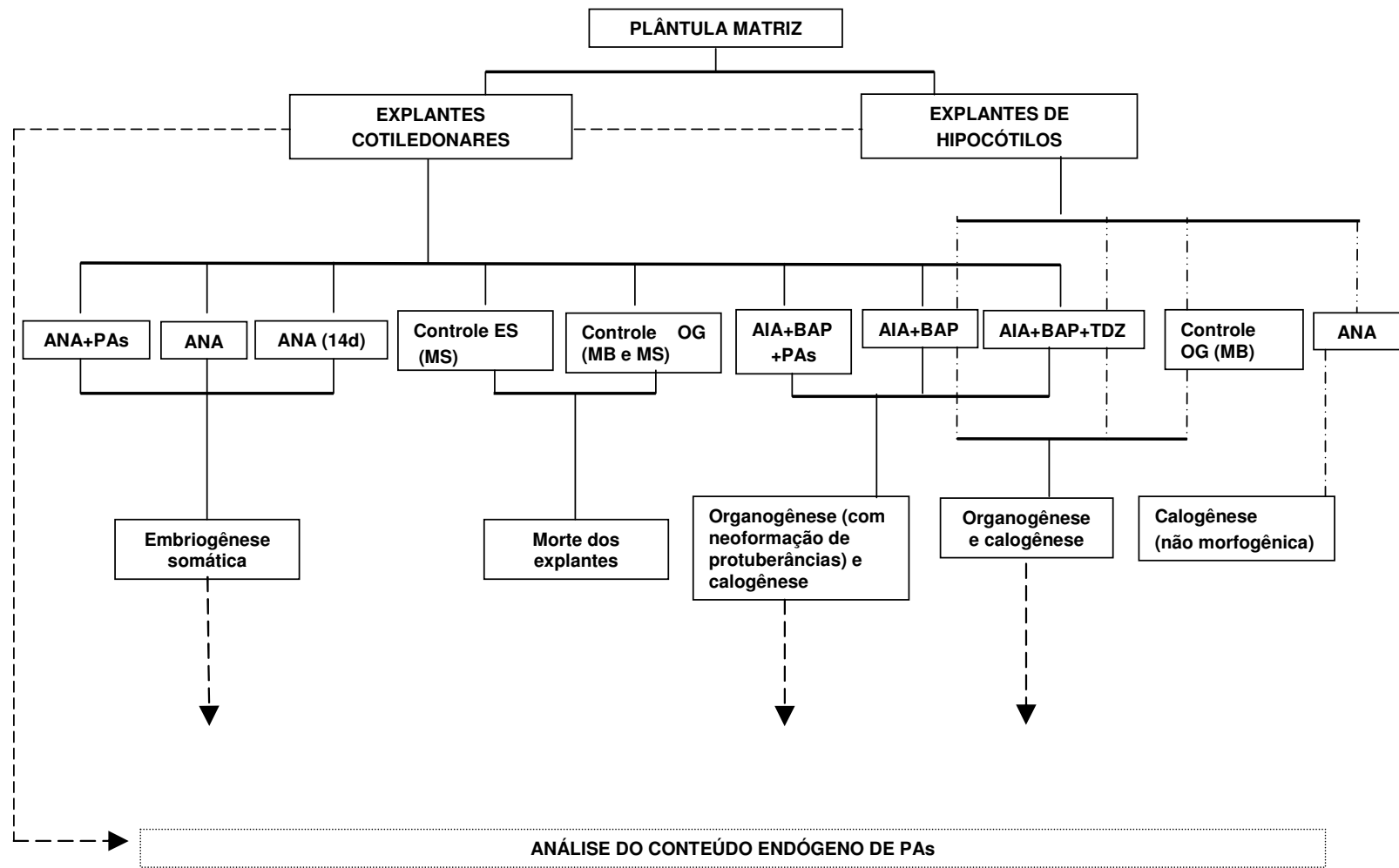


Figura 2. Delineamento experimental dos tratamentos realizados

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Padrões morfogênicos e crescimento dos explantes cultivados *in vitro*

##### 3.1.1 Embriogênese somática

Com relação ao padrão morfogênico e crescimento dos explantes cotiledonares cultivados *in vitro*, em meio indutor de ES, os principais resultados foram:

- a) Os explantes mantidos no tratamento controle não apresentaram nenhuma resposta morfogênica, morrendo após 14 dias de cultivo. Porém, uma concentração de 26,85  $\mu\text{M}$  de ANA, em explantes distais e proximais, mostrou-se eficiente para a indução de ES indireta.
- b) No tratamento ANA (Figura 3A–F), após 21 dias de cultivo, foi observado, inicialmente nas regiões seccionadas dos explantes, a presença de calo de textura granular e coloração branco-amarelada (Figura 3A e B). Após 24 dias de cultivo, ocorre o desenvolvimento dos primeiros embriões somáticos nos estágios globular e cordiforme inicial (Figura 3C e D). No período de 26 a 35 dias de cultivo ocorreu um aumento no número de embriões somáticos, desde o estágio globular até cotiledonar (Figura 3E e F).
- c) No tratamento ANA (14d) (Figura 3G–M), o desenvolvimento dos primeiros embriões, visualizados como pontuações verdes nos calos (Figura 3G e H), ocorreu precocemente em relação ao tratamento ANA, aos 21 dias de cultivo. Após 24 dias, ocorre um aumento no número e no desenvolvimento de embriões somáticos (Figura 3I e J). Os estágios embriogênicos torpedo e cotiledonar ocorreram aos 26 dias de cultivo (Figura 3K), observando-se a partir desse período um tamanho maior dos embriões em relação ao tratamento ANA (Figura 3E), bem como um aparente maior desenvolvimento (Figura 3L e M).
- d) Em relação ao crescimento dos explantes distais e proximais mantidos nos tratamentos embriogênicos nos quais foi considerada a presença de embriões (Figura 4), foi lento até o 14<sup>o</sup> dia de cultivo, seguido de um aumento contínuo da massa fresca, observando-se somente aos 35 dias uma diferença significativa entre os tratamentos ANA e ANA (14d). Independentemente do tratamento, os explantes proximais mostraram um crescimento maior que os distais (Figura 4).

Com relação ao padrão morfogênico dos explantes da região distal e proximal de hipocótilos cultivados *in vitro*, destaca-se que a concentração de 26,85  $\mu\text{M}$  de ANA foi inadequada para a indução de ES, promovendo apenas a formação de calo de aspecto esverdeado (não embriogênico), mesmo após 35 dias de cultivo. Por esse motivo, este tratamento não foi utilizado para as análises de crescimento e de PAs.

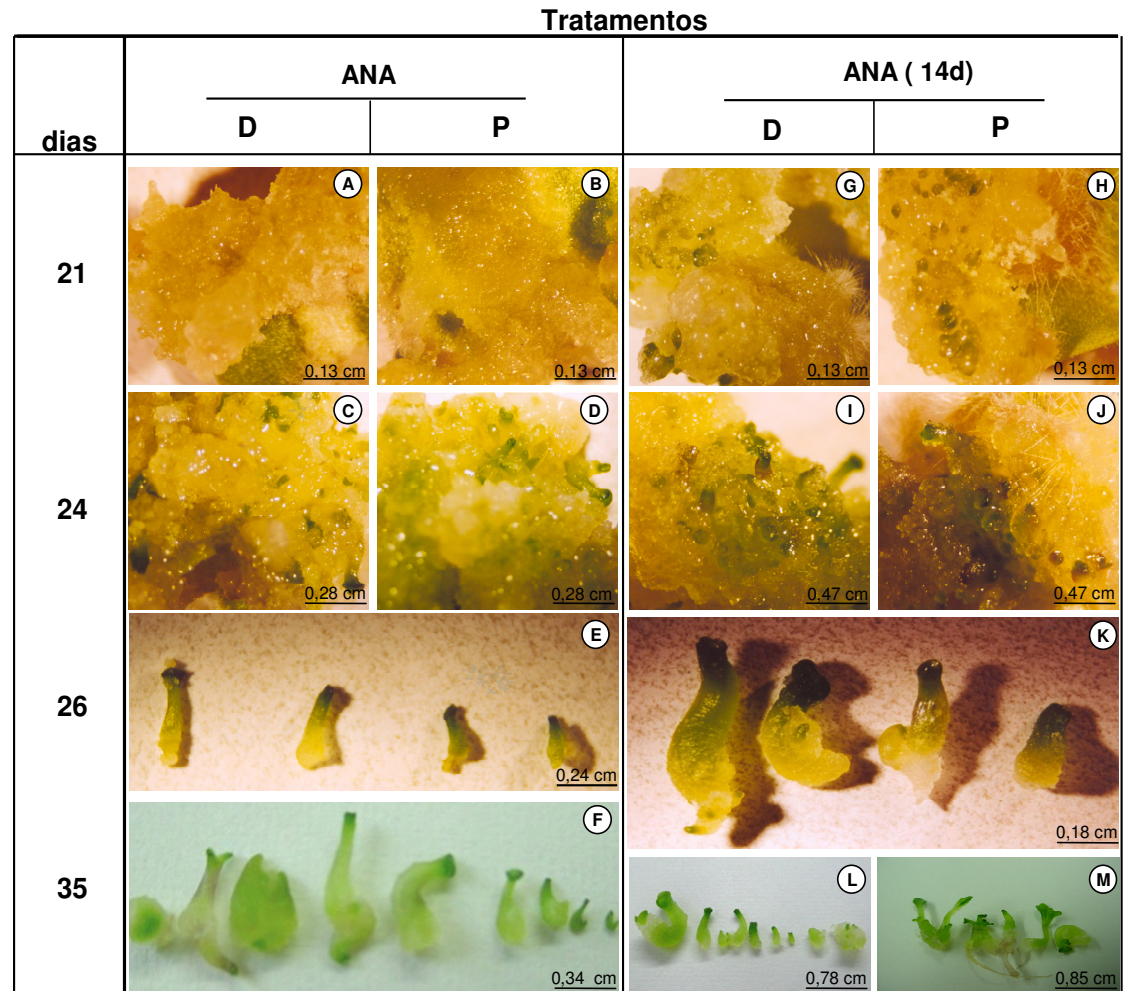


Figura 3. Respostas morfológicas em explantes de cotilédono, região distal (D) e proximal (P), em meio básico MS+ANA por 35 dias (ANA), e em meio básico MS+ANA por 14 dias e depois meio MS por 21 dias (ANA -14d), cultivados *in vitro*.

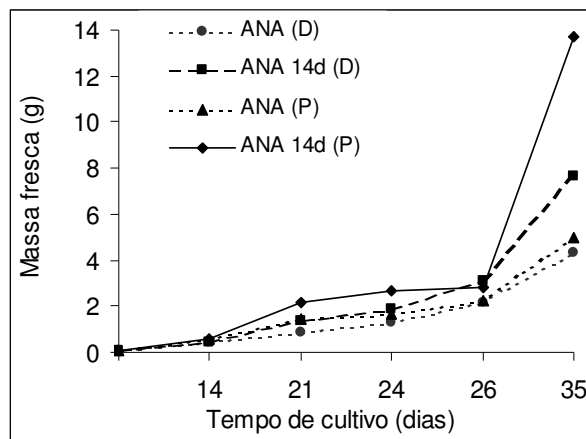


Figura 4. Massa fresca (g) das regiões distal (D) e proximal (P) de explantes cotiledonares, durante o cultivo *in vitro* em diferentes tratamentos (média; n=5).

### 3.1.2 Organogênese

Com relação ao padrão morfogenético e crescimento dos explantes cotiledonares (Figura 5A–L) cultivados *in vitro*, destaca-se que:

- a) Os explantes mantidos no tratamento controle (Figura 5A–D) não apresentaram nenhuma resposta morfogenética, morrendo após duas semanas de cultivo. Entretanto, para os explantes mantidos nos tratamentos AIA+BAP (Figura 5E–H) e AIA+BAP+TDZ (Figura 5I–L) as primeiras respostas morfogenéticas foram visualizadas após 13 dias de cultivo. No período de 19 a 25 dias de cultura, observou-se abundantes protuberâncias de textura compacta e coloração esbranquiçada, na face abaxial, e esverdeada na face adaxial. Não ocorreu qualquer evolução destas protuberâncias até o final do cultivo.
- b) O crescimento das culturas contendo fitorreguladores (Figura 6A) foi lento durante os primeiros sete dias, seguido de um aumento acentuado a partir dos 13 dias de cultivo. Posteriormente, aos 19 dias de cultura, os explantes proximais mostraram um crescimento maior em relação aos distais, independente do tratamento. No entanto, o maior crescimento foi observado nos explantes mantidos no tratamento AIA+BAP+TDZ quando comparado com aqueles mantidos no meio AIA+BAP, ao final da cultura.



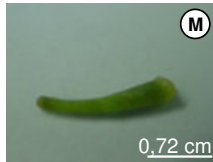
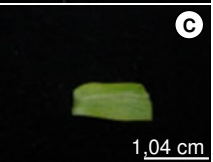
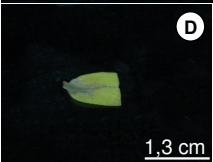
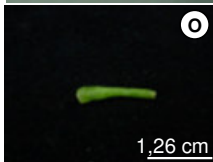



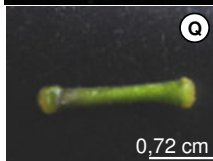
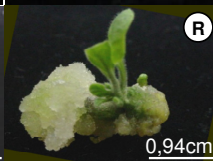


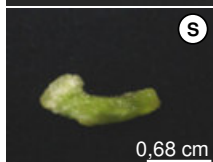

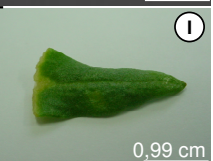

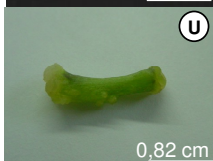
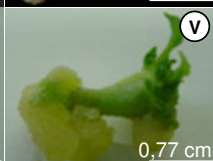
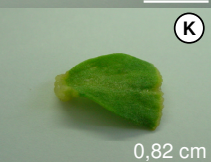

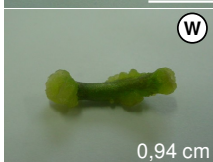
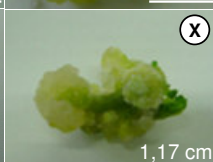
Tratamentos	dias	cotilédones		hipocótilos	
		7	19	7	19
		<b>MB</b>	<b>D</b>  1 cm	<b>B</b>  0,94 cm	<b>M</b>  0,72 cm
<b>P</b>  1,04 cm	<b>D</b>  1,3 cm	<b>O</b>  1,26 cm	<b>P</b>  0,41 cm		
<b>BAP+AIA</b>	<b>D</b>  0,70 cm	<b>F</b>  1,17 cm	<b>Q</b>  0,72 cm	<b>R</b>  0,94 cm	
<b>P</b>  0,78 cm	<b>H</b>  0,94 cm	<b>S</b>  0,68 cm	<b>T</b>  1,31 cm		
<b>BAP+AIA+TDZ</b>	<b>D</b>  0,99 cm	<b>J</b>  0,76 cm	<b>U</b>  0,82 cm	<b>V</b>  0,77 cm	
<b>P</b>  0,82 cm	<b>L</b>  0,75 cm	<b>W</b>  0,94 cm	<b>X</b>  1,17 cm		

Figura 5. Respostas morfogênicas em explantes de cotilédone e hipocótilo, região distal (D) e proximal (P), em meio básico MS+Vitaminas B<sub>5</sub>, cultivados *in vitro*.



Com relação ao padrão morfológico dos explantes da região distal e proximal de hipocótilos cultivados *in vitro*, destaca-se que:

- Os explantes mantidos nos tratamentos controle (Figura 5M–P), AIA+BAP (Figura 5Q–T) e AIA+BAP+TDZ (Figura 5U–X) apresentaram respostas organogênicas, visualizadas a partir do 13<sup>o</sup> dia de cultivo. Posteriormente, entre os 19 e 25 dias de cultura, foram observadas diferenças na morfologia das culturas mantidas nos diferentes meios utilizados, ocorrendo no tratamento AIA+BAP+TDZ um maior desenvolvimento dos calos quando comparado com o tratamento AIA+BAP, e este em comparação ao controle.
- Independente do balanço hormonal e da região do explante verificou-se que a capacidade morfogenética difere entre as extremidades dos mesmos, regenerando preferentemente gemas na extremidade apical e calo na basal (Figura 5M-X).
- Para todos os tratamentos (Figura 6B), durante os primeiros sete dias de cultura, ocorreu um crescimento lento em MF, seguido de um aumento até o final do cultivo, quando foram observados os valores máximos. O crescimento em MF dos explantes proximais cultivados nos tratamentos controle e AIA+BAP, foi maior em relação aos explantes distais, enquanto que mantidos no tratamento AIA+BAP+TDZ, o crescimento de ambos os explantes foi semelhante. Nos tratamentos com fitorreguladores ocorreu um aumento da MF maior que no controle.

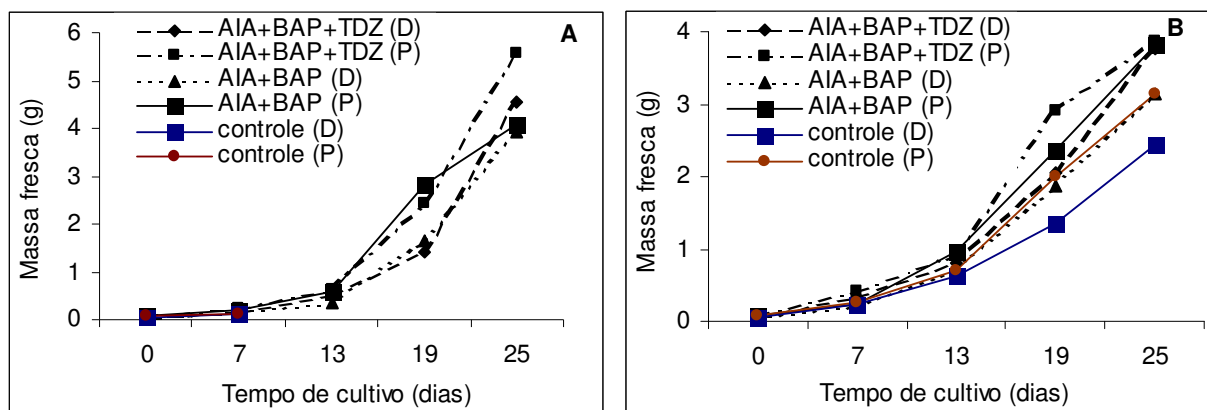


Figura 6. Massa fresca (g) das regiões distal (D) e proximal (P) de explantes cotilédones (A) e de hipocótilo (B), durante o cultivo *in vitro* em diferentes meios de cultura (média; n=5).

Resumindo, ao comparar-se explantes de cotilédone e hipocótilo, verificou-se a ocorrência de diferenças no potencial morfogenético: a) os explantes de hipocótilo mostraram regeneração de gemas e calos friáveis quando cultivados em meio básico sem fitorreguladores ou quando mantidos nos tratamentos AIA+BAP e AIA+BAP+TDZ; b) nos explantes de cotilédone, a resposta morfogenética foi decorrente da suplementação do meio básico com fitorreguladores, já que no caso contrário não houve resposta, ocorrendo a morte dos

explantes. O potencial organogênico dos cotilédones mantidos nos tratamentos AIA+BAP e AIA+BAP+TDZ foi menor em relação aos hipocótilos. Nos cotilédones observou-se uma progressão na evolução morfogênica, não definida, ocorrendo principalmente protuberâncias que não evoluíram para brotações; d) para ambos os tipos de explantes, não foram observadas diferenças acentuadas na morfologia entre a região distal e proximal; e) o potencial organogênico é diferente entre as extremidades apical e basal dos explantes de hipocótilo; f) a resposta morfogênica foi acentuada quando adicionado TDZ ao meio organogênico, sendo que nos cotilédones ocorreu o desenvolvimento de protuberâncias, e nos hipocótilos o aumento do desenvolvimento de calos e gemas; g) em explantes de cotilédone, a suplementação do meio básico (MS) com ANA foi imprescindível para a ocorrência de ES; e) em explantes de hipocótilo, a concentração utilizada neste trabalho não induziu o processo embriogênico.

### 3.2 Padrão e conteúdo de PAs

#### 3.2.1 Padrão e conteúdo inicial nos explantes

Com relação às PAs livres e conjugadas nos cotilédones e hipocótilos (Tabela 2), cabe destacar que:

- Os conteúdos endógenos de Put e Spd, nas formas livres e conjugadas, foram maiores nos cotilédones em relação aos hipocótilos, enquanto que os conteúdos de Spm foram baixos e semelhantes. Destaca-se que em ambos os explantes a forma livre foi mais abundante que a forma conjugada. Particularmente, a Put livre é pelo menos 10 vezes mais abundante nos explantes de cotilédone em relação aos de hipocótilo, podendo estar positivamente relacionado com a capacidade embriogênica do explante cotiledonar.
- Com relação à região do explante, somente foi observada uma diferença significativa nos conteúdos endógenos de Put livre, que foram maiores nas regiões distais de cotilédones e hipocótilos quando comparados às regiões proximais destes explantes.
- Nos explantes cotiledonares, a Put foi predominante, seguida da Spd e Spm, tanto nas formas livres quanto nas formas conjugadas.
- Na região distal dos explantes de hipocótilo, as diferentes PAs, na forma livre e conjugada, foram detectadas. Entretanto, na região proximal só a fração livre das PAs foi detectada. Os conteúdos destas PAs foram muito baixos.

Tabela 2. Conteúdo endógeno de PAs da região distal e proximal, de explantes de cotilédone e hipocótilo (média  $\pm$  desvio padrão; n=3).

PAs	Forma	Explantes cotiledonares		Explantes de hipocótilos	
		região distal (A)	região proximal (B)	região distal (C)	região proximal (D)
Putrescina ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ de MF)	Livre	228,97 $\pm$ 35,01	122,69 $\pm$ 27,26	12,04 $\pm$ 2,84	3,41 $\pm$ 0,25
	Conjugada	37,60 $\pm$ 11,64	32,69 $\pm$ 9,88	4,56 $\pm$ 0,29	<sup>a</sup>
Espermidina ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ de MF)	Livre	22,73 $\pm$ 1,08	15,67 $\pm$ 1,73	7,55 $\pm$ 1,10	6,89 $\pm$ 0,80
	Conjugada	6,51 $\pm$ 2,04	5,59 $\pm$ 0,99	2,14 $\pm$ 0,38	<sup>a</sup>
Espermina ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ de MF)	Livre	1,43 $\pm$ 0,32	1,10 $\pm$ 0,07	2,04 $\pm$ 0,36	3,16 $\pm$ 0,59
	Conjugada	<sup>a</sup>	0,09 $\pm$ 0,02	0,26 $\pm$ 0,05	<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Não detectado

### 3.2.2 Variação no conteúdo de PAs durante os processos morfogênicos

#### 3.2.2.1 Embriogênese somática

Durante o desenvolvimento da ES, foi avaliada a variação no conteúdo de PAs, na sua forma livre e conjugada, e a razão de PAs, nas regiões distais e proximais de explantes cotiledonares cultivados *in vitro*.

Com relação à variação das PAs totais (Figura 7), os principais resultados foram:

- Em cultura, o conteúdo decresceu ao longo do tempo, tanto em explantes distais (Figura 7A) quanto proximais (Figura 7B), ocorrendo os menores valores aos 35 dias.
- Este decréscimo foi mais acentuado no tratamento ANA (14d) em relação ao tratamento ANA, especialmente para a região distal.
- No tratamento controle (Figura 7A e B), o conteúdo foi menor que aqueles observados nas culturas com fitorregulador até os 14 dias. Após esse período, não foi realizada a quantificação de PAs devido à morte dos explantes.

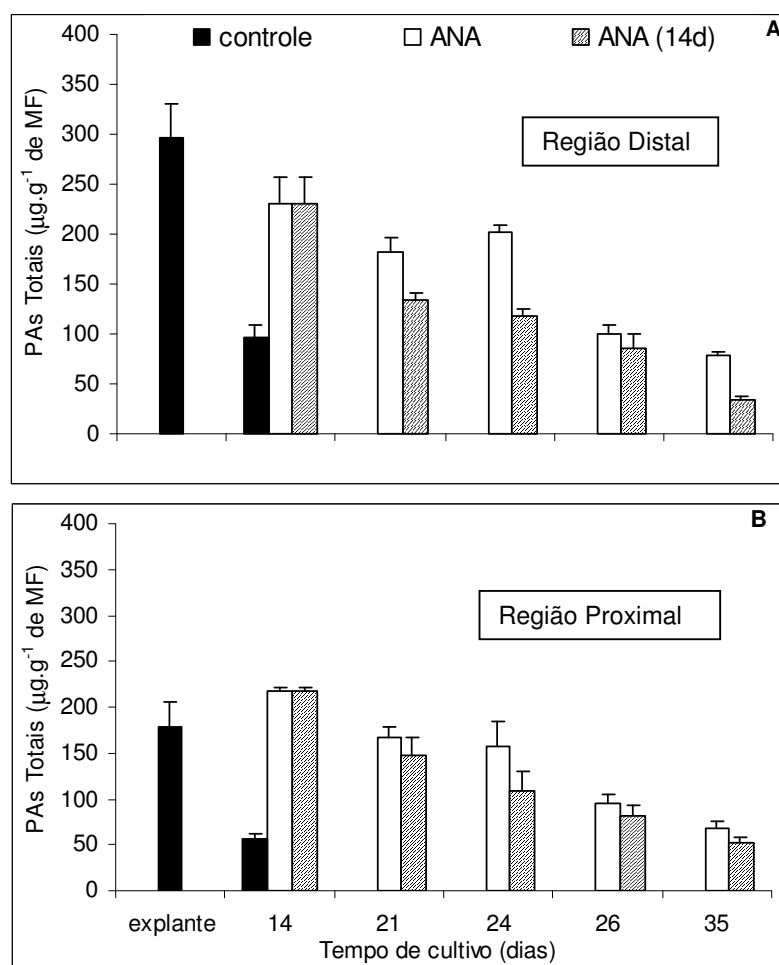


Figura 7. Variação do conteúdo endógeno de PAs totais na região distal (A) e proximal (B), de explantes cotiledonares durante cultivo *in vitro*, em diferentes meios de cultura (média  $\pm$  desvio padrão; n=3).

A partir destes resultados, pode-se concluir que para o processo de ES, os maiores valores de PAs totais ocorrem antes do desenvolvimento e maturação dos embriões somáticos, aos 14 dias de cultivo, durante a indução da ES. O desenvolvimento e a maturação destes embriões poderia estar associado a uma diminuição nos conteúdos de PAs totais. Adicionalmente, observou-se que o ANA teve um efeito sobre a biossíntese de PAs totais, e que esse efeito é maior quando a presença de ANA é contínua.

Com relação à variação das PAs livres (Figura 8) , os principais resultados foram:

- a) Em todos os tratamentos a Spd livre ocorreu em maior concentração que a Put e a Spm, durante todo o período de cultivo.
- b) Nos tratamentos ANA e ANA (14d), aos 14 dias de cultivo o nível de Put decresceu acentuadamente (Figura 8A e B), enquanto a Spd e a Spm apresentaram os níveis mais altos (8C-F). Em seguida, os níveis de Put, Spd e Spm decresceram, até os 35 dias de cultivo, quando foram observados os menores valores (Figura 8A-F).
- c) Entre os 21 e 35 dias de cultivo, o decréscimo da Spd e Spm livres foi mais acentuado no tratamento ANA (14d), decorrente da retirada do ANA do meio de cultivo, em relação ao tratamento ANA.
- d) No tratamento ANA (14d), os conteúdos de Spd e Spm diminuíram mais acentuadamente nos explantes proximais (Figura 8D e F) que nos distais (Figura 8C e E), particularmente entre os 21 e 24 dias de cultivo. Entretanto, nesse mesmo período, no tratamento ANA os valores de Spd e Spm foram muito semelhantes nas duas regiões (Figura 8C e E).
- e) No tratamento controle (Figura 8A-F), aos 14 dias de cultivo, os conteúdos de Put, Spd e Spm livres foram menores àqueles ocorridos nos tratamentos ANA e ANA (14d), especialmente de Put e Spm endógenos. Após esse período, não foi realizada a quantificação de PAs, devido à morte dos explantes.

Com relação à variação das PAs conjugadas (Figura 9), os principais resultados foram:

- a) Nos tratamentos ANA e ANA (14d), a Put (Figura 9A e B) ocorreu em maiores quantidades que a Spd (Figura 9C e D) e Spm (Figura 9E e F), as quais mantiveram conteúdos semelhantes, em todo o período de cultura.
- b) Aos 14 dias de cultivo, nos explantes distais e proximais cultivados no controle, os níveis de Put, Spd e Spm conjugadas (Figura 9A-F) eram inferiores aos observados nos tratamentos ANA e ANA (14d), nos quais observou-se um aumento dos conteúdos da fração conjugada de PAs (Figura 9A-F) em relação ao valor inicial (explante). No final do período de cultivo, nos tratamentos ANA e ANA (14d), os conteúdos de PAs conjugadas foram inferiores aos observados no 14<sup>o</sup> dia de cultivo.

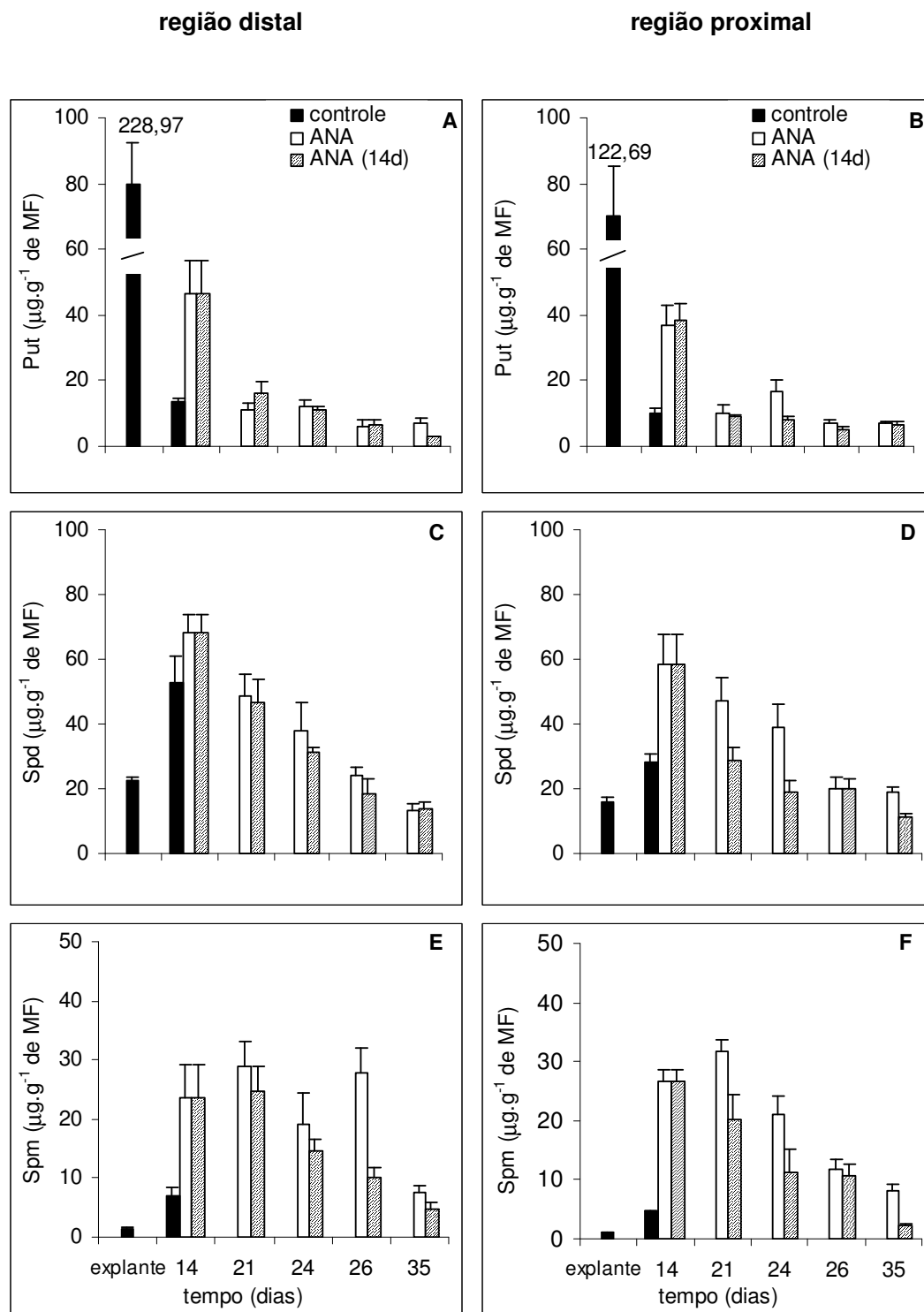


Figura 8. Variação no conteúdo endógeno das diferentes PAs livres, na região distal (A,C,E) e proximal (B,D,F) de explantes cotiledonares, durante o cultivo *in vitro* em diferentes meios de cultura (média ± desvio padrão; n=3). (notar a escala diferente para Spm).

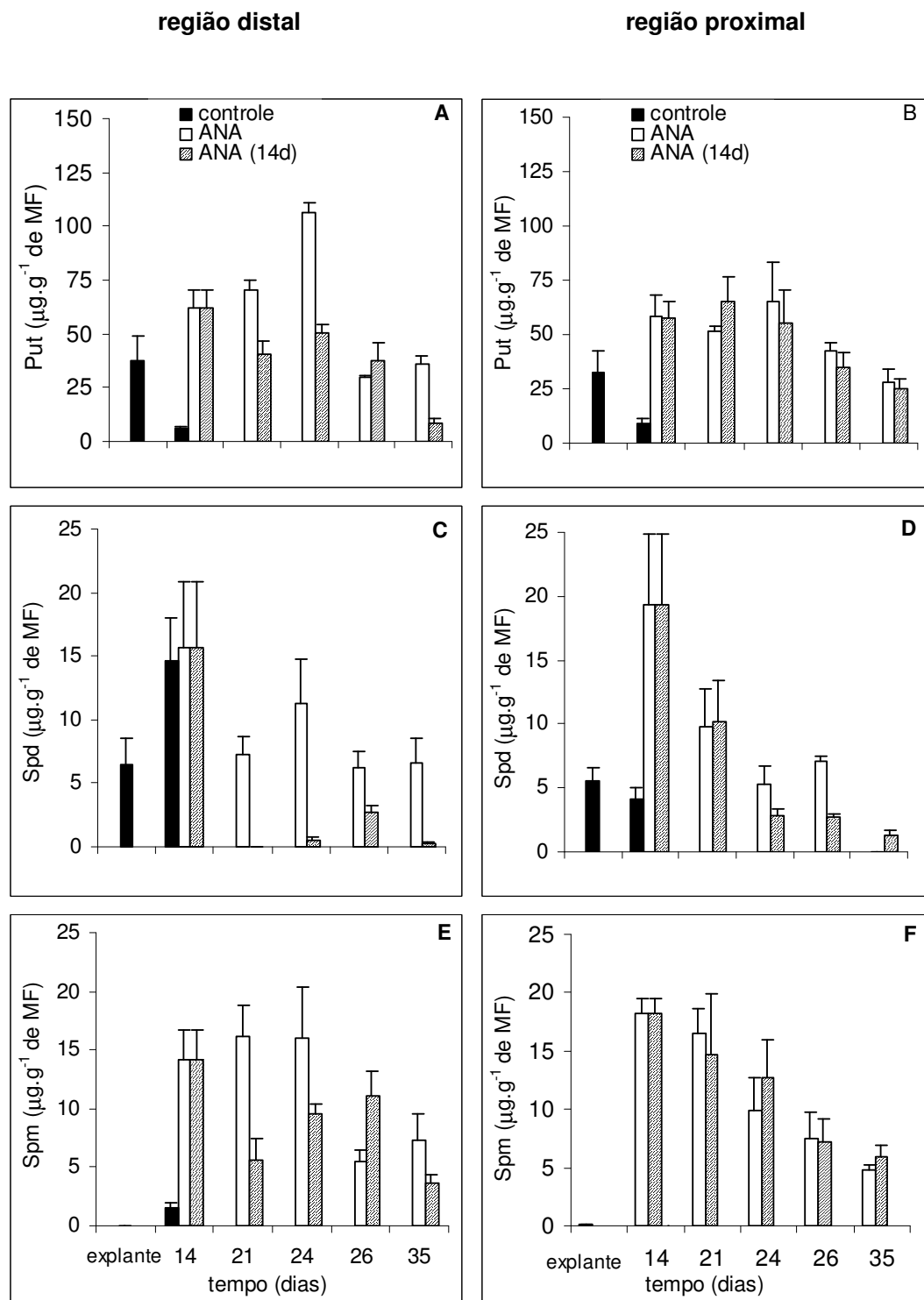


Figura 9. Variação do conteúdo endógeno das diferentes PAs conjugadas, na região distal (A,C,E) e proximal (B,D,F) de explantes cotiledonares, durante o cultivo *in vitro* em diferentes meios (média  $\pm$  desvio padrão; n=3). (notar a escala diferente para a Put).

Com relação à variação da razão de PAs (Figura 10), verificou-se que explantes distais (Figura 10A) apresentaram valores iniciais (explante) superiores aos proximais (Figura 10B). Em cultura, ocorre um decréscimo acentuado que se manteve estável até o final do cultivo, onde ocorreram valores semelhantes para os explantes distais e proximais. Este maior valor na relação de PAs se deve às maiores concentrações de Put nos explantes iniciais, sendo que o decréscimo resultou da redução de Put e aumento de Spd e Spm ao longo do cultivo.

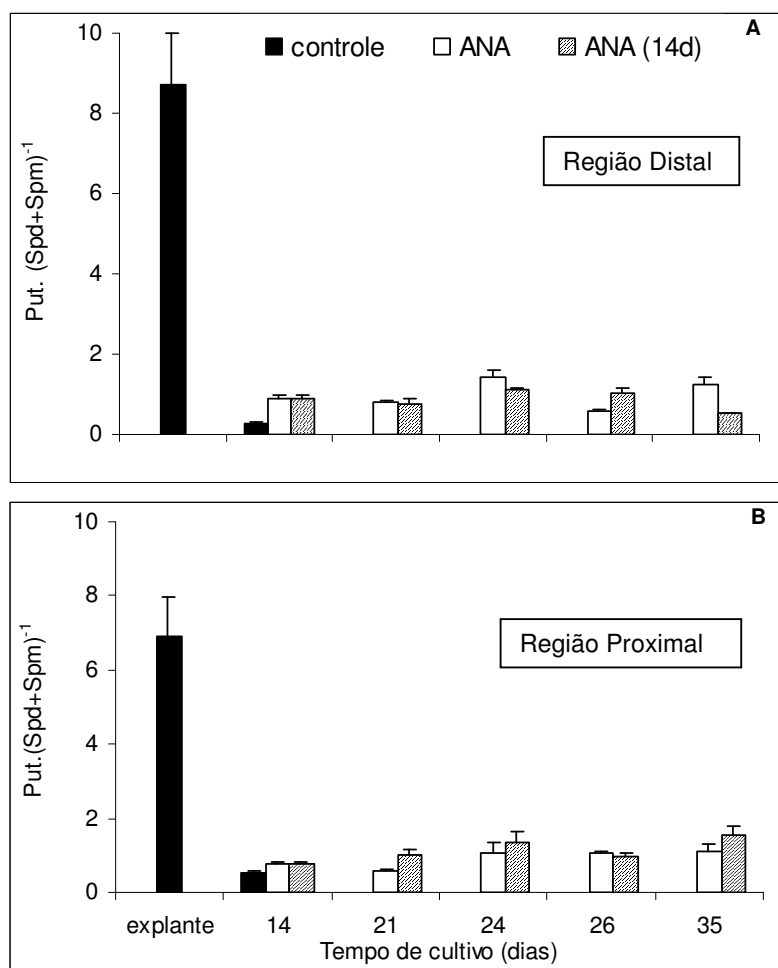


Figura 10. Razão de PAs [Put.(Spd+Spm)<sup>-1</sup>] a partir da região distal (A) e proximal (B) de explantes cotiledonares durante cultivo *in vitro* em diferentes meios de cultura. (média  $\pm$  desvio padrão; n=3).

### 3.2.2.2 Culturas organogênicas

Durante a organogênese, foi avaliada a variação no conteúdo de PAs totais, na sua forma livre e conjugada, e a razão de PAs, nas regiões distais e proximais de explantes cotiledonares e de hipocótilo cultivados *in vitro*.



### 3.2.2.2.1 Explantes de cotilédones

Com relação à variação das PAs totais (Figura 11), os principais resultados foram:

- ao início da cultura, os níveis decresceram acentuadamente, especialmente no controle. A partir do 7<sup>o</sup> dia de cultivo ocorreu um aumento progressivo nos tratamentos AIA+BAP e AIA+BAP+TDZ, atingindo valor máximo aos 19 dias;
- no período de 19 a 25 dias em cultura, ocorreu uma redução para os explantes cultivados no tratamento AIA+BAP (Figura 11A e B), enquanto aqueles no tratamento AIA+BAP+TDZ, os níveis se mantiveram constantes;
- no tratamento controle, a partir do 13<sup>o</sup> dia de cultura, não foram quantificadas as PAs totais (Figura 11A e B), devido à morte dos explantes.

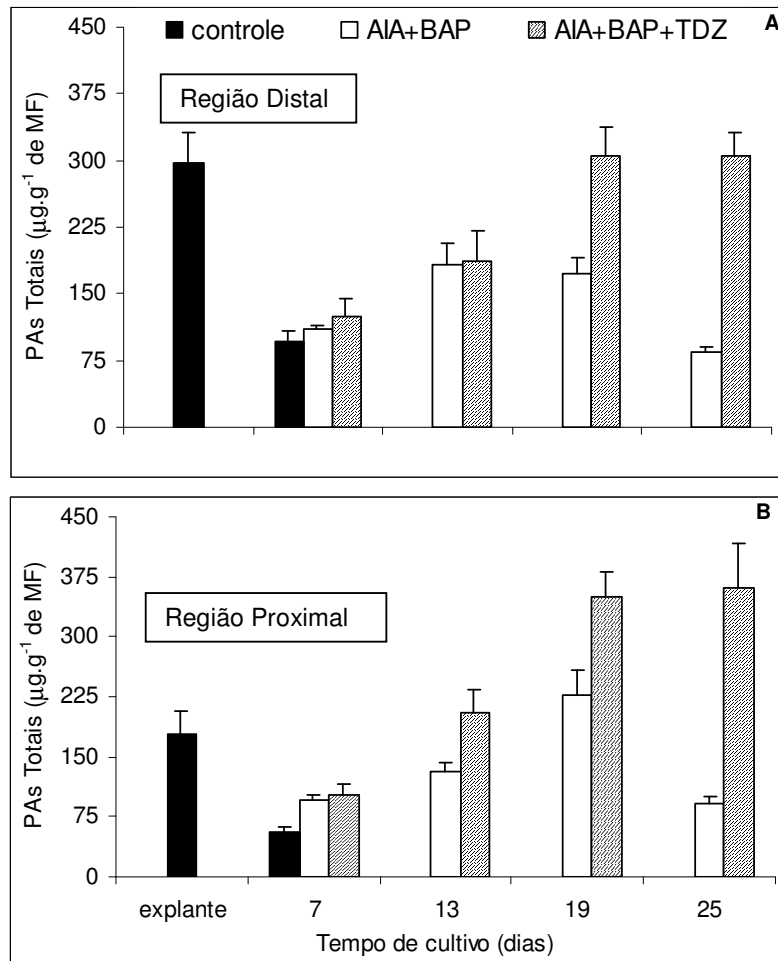


Figura 11. Variação do conteúdo endógeno de PAs totais na região distal (A) e proximal (B) de explantes cotilédones durante o cultivo *in vitro*, em diferentes meios de cultura (média  $\pm$  desvio padrão; n=3).

Com relação à variação das PAs livres (Figura 12), os principais resultados foram:

- a Spd, em todos os tratamentos, foi a PA que ocorreu em maior concentração quando comparada a Put e a Spm, durante todo o período de cultivo;

- b) os conteúdos de Put (Figura 12A e B) decresceram enquanto os de Spd (Figura 12C e D) e Spm (Figura 12E e F) aumentaram até 7 dias de cultura, independentemente do tratamento. A partir do 13<sup>o</sup> dia até o final do cultivo houve uma pequena redução nos níveis das PAs;
- c) os explantes distais e proximais cultivados no tratamento AIA+BAP, mostraram um padrão de variação similar para os conteúdos de Put, Spd e Spm livres (Figura 12A-F);
- d) para o tratamento AIA+BAP+TDZ o padrão de variação das PAs foi diferente para os explantes distais e proximais (Figura 12A-F), sendo que os explantes proximais apresentaram maiores níveis de PAs livres quando comparado ao tratamento AIA+BAP, especialmente aos 25 dias de cultivo.

Com relação à variação de cada uma das PAs conjugadas (Figura 13), os principais resultados foram:

- a) para todos os tratamentos a Put apresentou os maiores níveis, mostrando um padrão de variação semelhante ao das PAs totais. Nos tratamentos AIA+BAP e AIA+BAP+TDZ a Spm (Figura 13E e F) mostrou níveis intermediários e a Spd (Figura 13C e D) os menores. Entretanto, no controle ocorreu o inverso;
- b) os níveis de Put, aos sete dias de cultivo, nos tratamentos AIA+BAP e AIA+BAP+TDZ (Figura 13A e B) foram semelhantes aos iniciais, enquanto no tratamento controle os níveis diminuíram acentuadamente (Figura 13A e B). A partir deste momento, o tratamento AIA+BAP+TDZ apresentou níveis maiores de Put que o tratamento AIA+BAP, especialmente aos 25 dias de cultivo;
- c) os níveis de Spd (Figura 13C e D) e Spm também foram superiores no tratamento AIA+BAP+TDZ quando comparado com o tratamento AIA+BAP, apresentando um padrão de variação semelhante ao da Put a partir dos 19 dias de cultivo;
- d) a Put conjugada (Figura 13A e B) foi detectada em concentrações maiores em relação à Put livre, o mesmo ocorrendo para a Spm conjugada (Figura 13E e F) quando comparada à Spm livre, a partir dos 13 dias até os 25 dias de cultivo.

Com relação à relação inicial de PAs (Figura 14), foi maior nos explantes distais em relação aos proximais (explante), com posterior decréscimo para todos os tratamentos (Figura 14A e B), sendo este mais acentuado no controle. Ao longo do cultivo, nos tratamentos AIA+BAP e AIA+BAP+TDZ, essa razão foi mantida sem diferenças entre as diferentes regiões do explante utilizado.

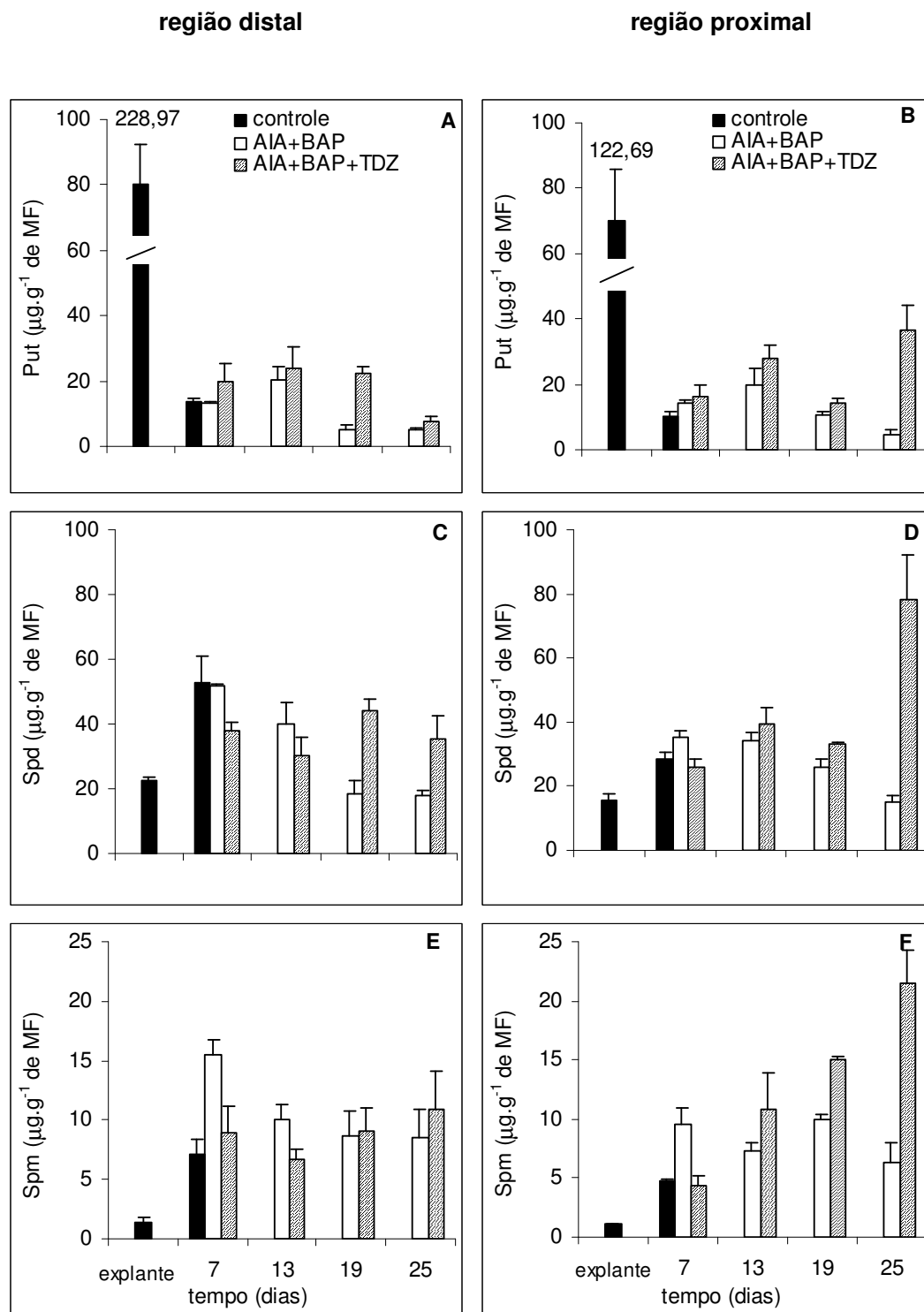


Figura 12. Variação das PAs livres em culturas obtidas a partir da região distal (A, C, E) e proximal (B, D, F) de explantes cotiledonares, durante o cultivo *in vitro* em diferentes meios de cultura (média  $\pm$  desvio padrão; n=3). (notar escala diferente para Spm).

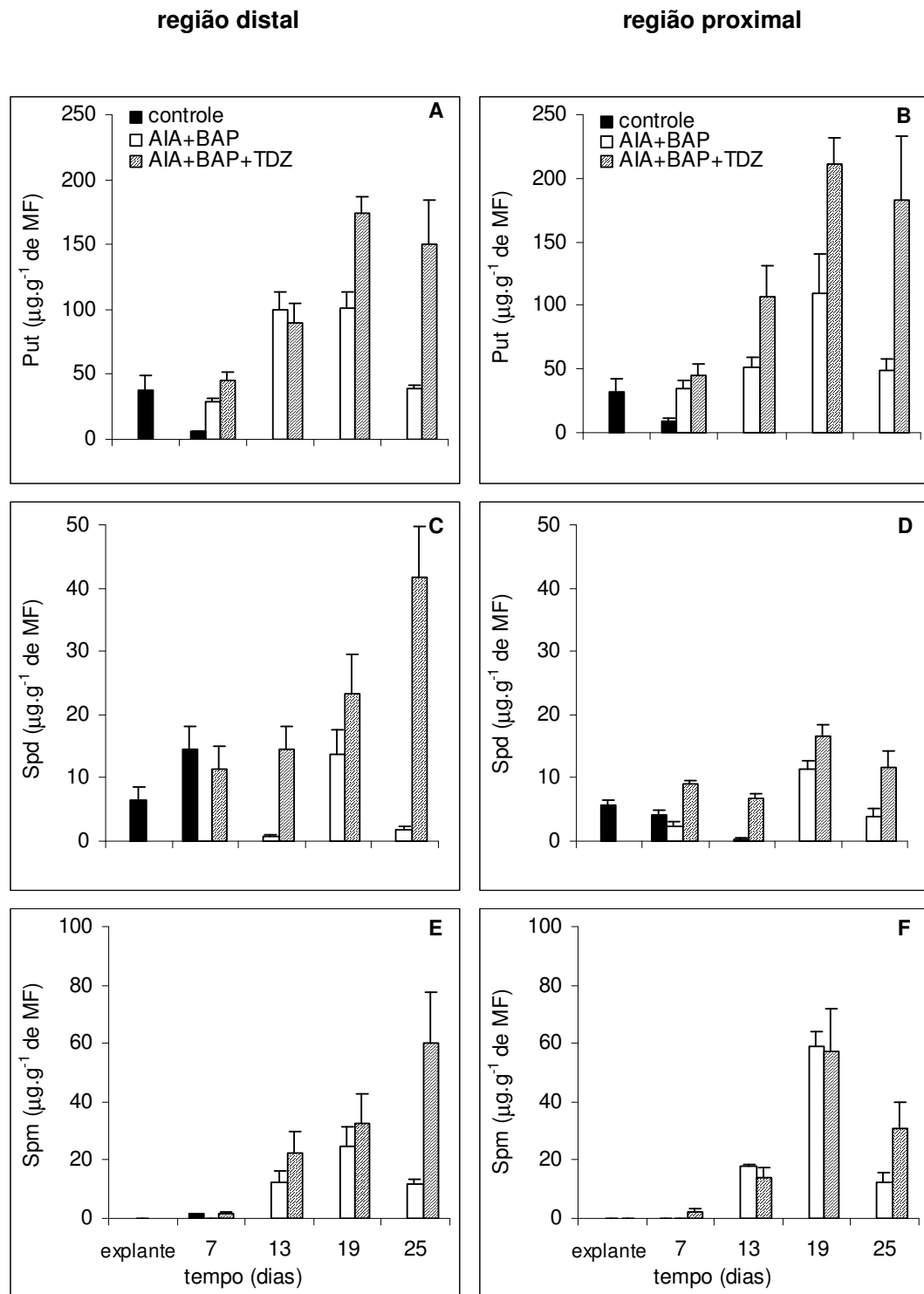


Figura 13. Variação das PAs conjugadas em culturas obtidas a partir da região distal (A, C, E) e proximal (B, D, F) de explantes cotiledonares, durante o cultivo *in vitro* em diferentes meios (média  $\pm$  desvio padrão; n=3). (notar escala diferente para as três PAs)

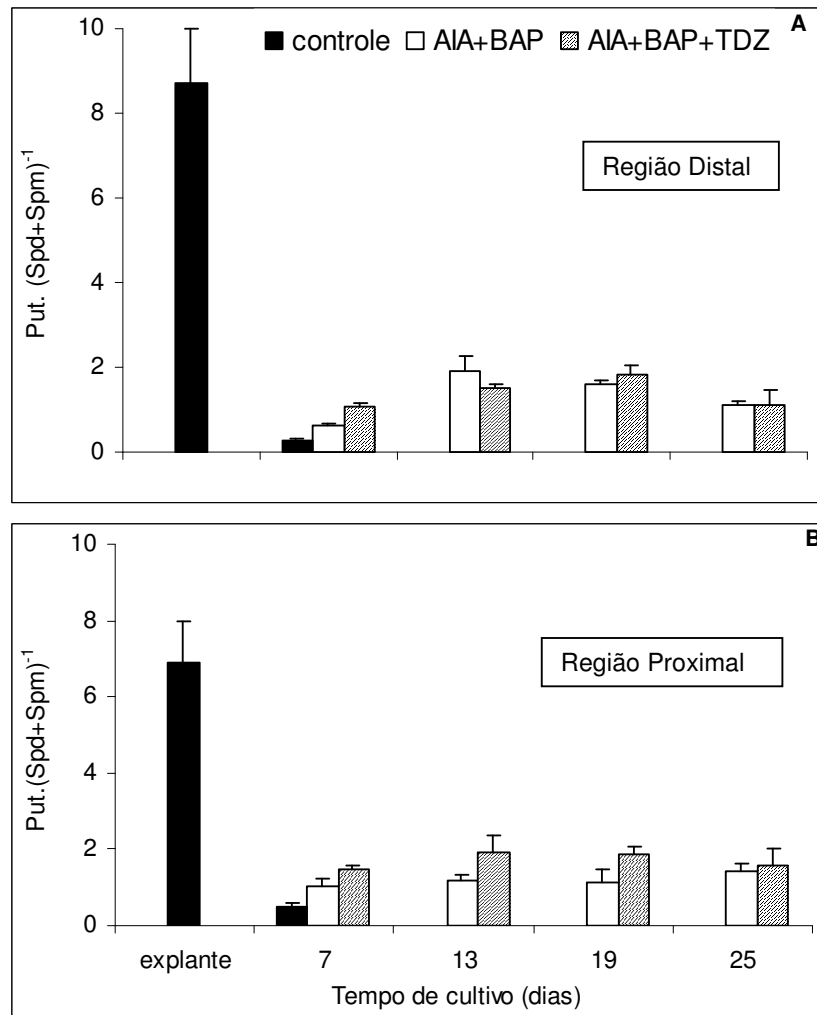


Figura 14. Razão de PAs [Put.(Spd+Spm)<sup>-1</sup>] em culturas obtidas a partir da região distal (A) e proximal (B) de explantes cotiledonares, durante o cultivo *in vitro* em diferentes meios de cultura (média  $\pm$  desvio padrão; n=3).

### 3.2.2.2 Explantes de hipocótilos

Com relação à variação das PAs totais (Figura 15), os principais resultados foram:

- em todos os tratamentos os níveis aumentaram até os 13 dias de cultivo, com posterior estabilização. Níveis mais elevados ocorreram no tratamento AIA+BAP+TDZ, a partir do 13<sup>o</sup> dia de cultivo. Não foram observadas diferenças significativas ao compararem-se os explantes distais (Figura 15A) com os proximais (Figura 15B).

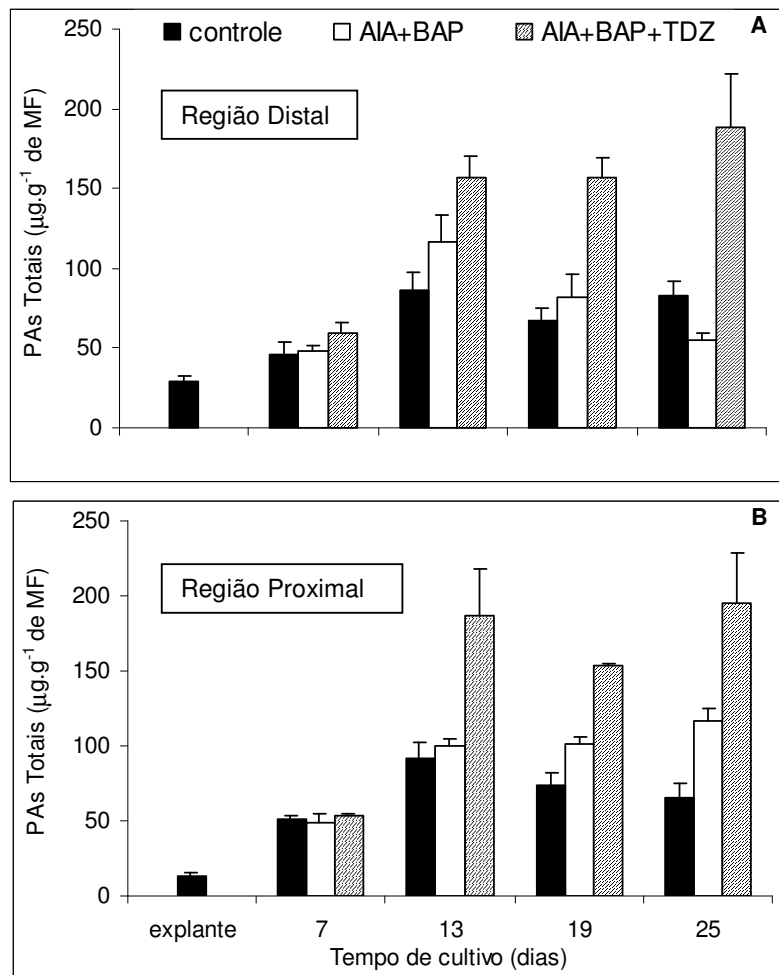


Figura 15. Variação do conteúdo endógeno de PAs totais em culturas obtidas da região distal (A) e proximal (B) de explantes de hipocótilos, durante o cultivo *in vitro* em diferentes meios (média  $\pm$  desvio padrão; n=3).

Com relação à variação das PAs livres (Figura 16), os principais resultados foram:

- a) a Spd livre foi a PA predominante quando comparada com a Put e Spm, durante todo o período em cultura;
- b) aos 7 dias de cultivo, os níveis de Put, Spd e Spm foram semelhantes nos vários tratamentos, sendo os valores de Spd e Spm maiores que os iniciais;
- c) os conteúdos de Put e Spd mostraram uma tendência de aumento, especialmente para o tratamento AIA+BAP+TDZ. Entretanto, os níveis de Spm em todos os tratamentos se mantiveram estáveis até o final de cultivo, sem ocorrer diferenças significativas nos diferentes explantes;

- d) após os 13 dias de cultura, nos tratamentos AIA+BAP e controle, os conteúdos de Put e Spd diminuíram continuamente até o final do cultivo, enquanto no tratamento AIA+BAP+TDZ esses valores não mostraram variação, até os 25 dias de cultivo;
- e) no tratamento controle, em geral, os níveis de Put, Spd e Spm foram semelhantes àqueles do tratamento AIA+BAP.

Com relação à variação das diferentes PAs conjugadas (Figura 17), os principais resultados foram:

- a) ao longo do cultivo, as PAs conjugadas foram identificadas em ambas as regiões, sendo a Put (Figura 17A e B) a PA predominante, seguida da Spm (Figura 17E e F) (ambas com valores maiores que os da forma livre), e da Spd (Figura 17C e D);
- b) os níveis de Put nos explantes distais (Figura 18A) e proximais (Figura 17B) aumentaram de forma contínua até o 13<sup>o</sup> dia de cultivo, sendo que o aumento foi mais acentuado no tratamento AIA+BAP+TDZ quando comparado aos tratamentos AIA+BAP e controle, os quais apresentaram conteúdos semelhantes, porém menores até o final do cultivo;
- c) os níveis de Spd (Figura 17C e D) não apresentaram nenhum padrão de variação uniforme em qualquer momento, quando comparados todos os tratamentos, e quando detectados, os conteúdos foram muito baixos.
- d) os níveis de Spm nos explantes distais (Figura 17E) e proximais (Figura 17F) foram menores no tratamento controle, intermediários no tratamento AIA+BAP e maiores no tratamento AIA+BAP+TDZ.

Quanto à variação da relação de PAs (Figura 18), verificou-se que a razão inicial de PAs foi maior nos explantes distais (Figura 19A) que nos proximais (Figura 18B). Aos sete dias de cultura, a razão foi semelhante nos dois tipos de explantes, sendo que ao longo do cultivo variou pouco, sem mostrar uma diferença acentuada entre os tratamentos.

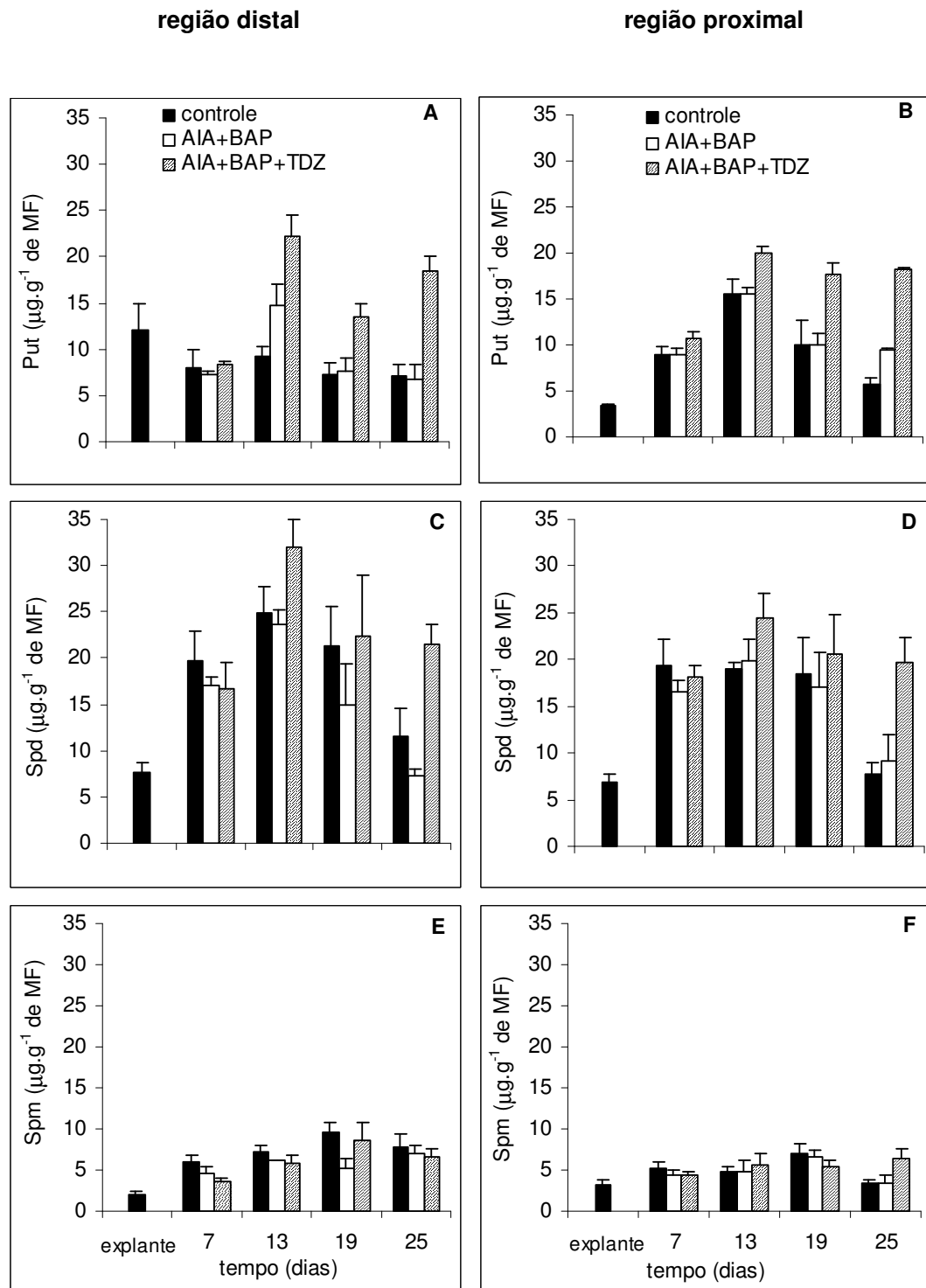


Figura 16. Perfil de PAs livres, na região distal (A, C, E) e proximal (B, D, F) de explantes de hipocótilo, durante o cultivo *in vitro* em diferentes meios de cultura (média  $\pm$  desvio padrão; n=3).



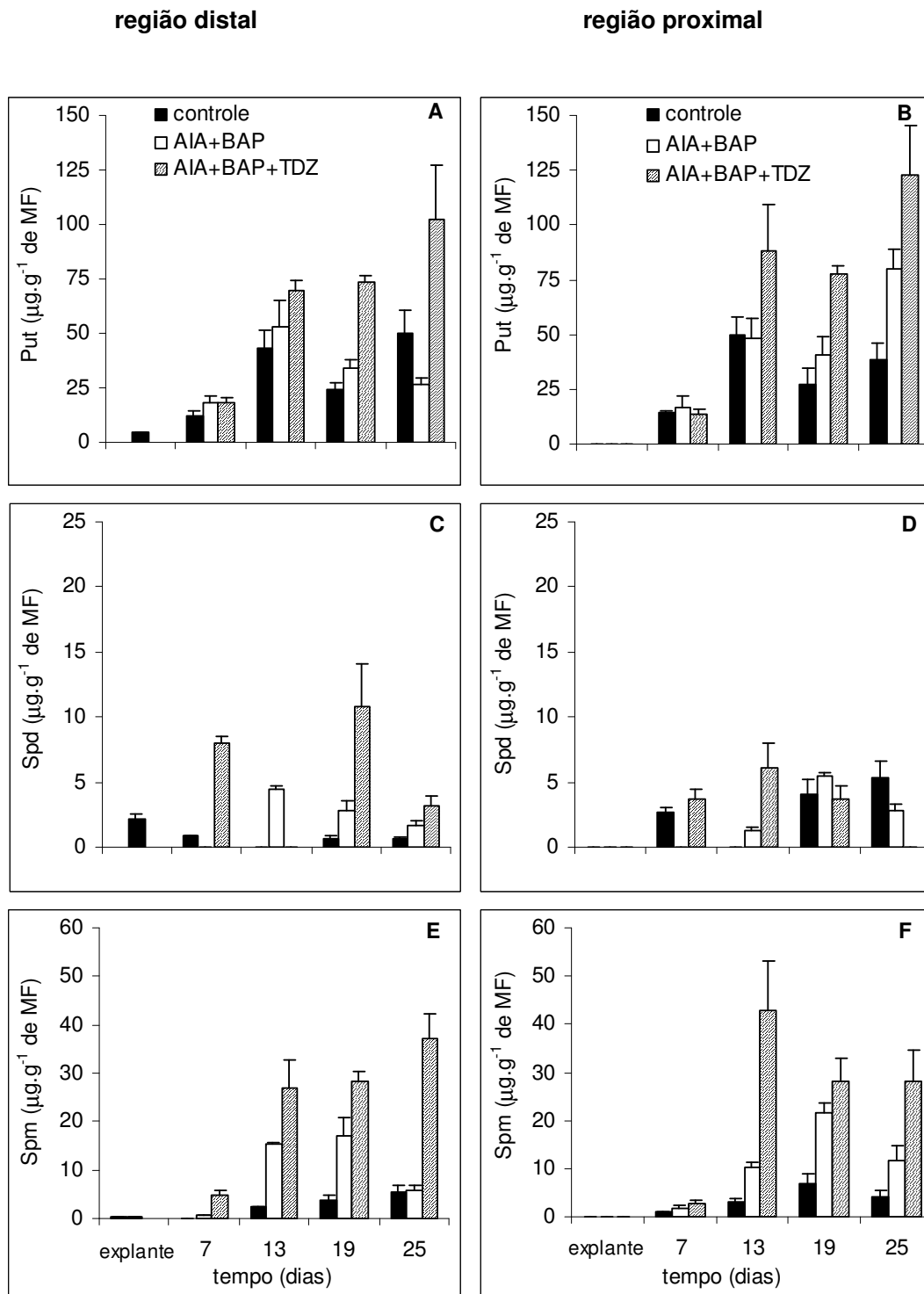


Figura 17. Perfil das PAs conjugadas, na região distal (A, C, E) e proximal (B, D, F) de explantes de hipocótilos, durante o cultivo *in vitro* em diferentes meios de cultura (média  $\pm$  desvio padrão; n=3) (notar escala diferente para as PAs).

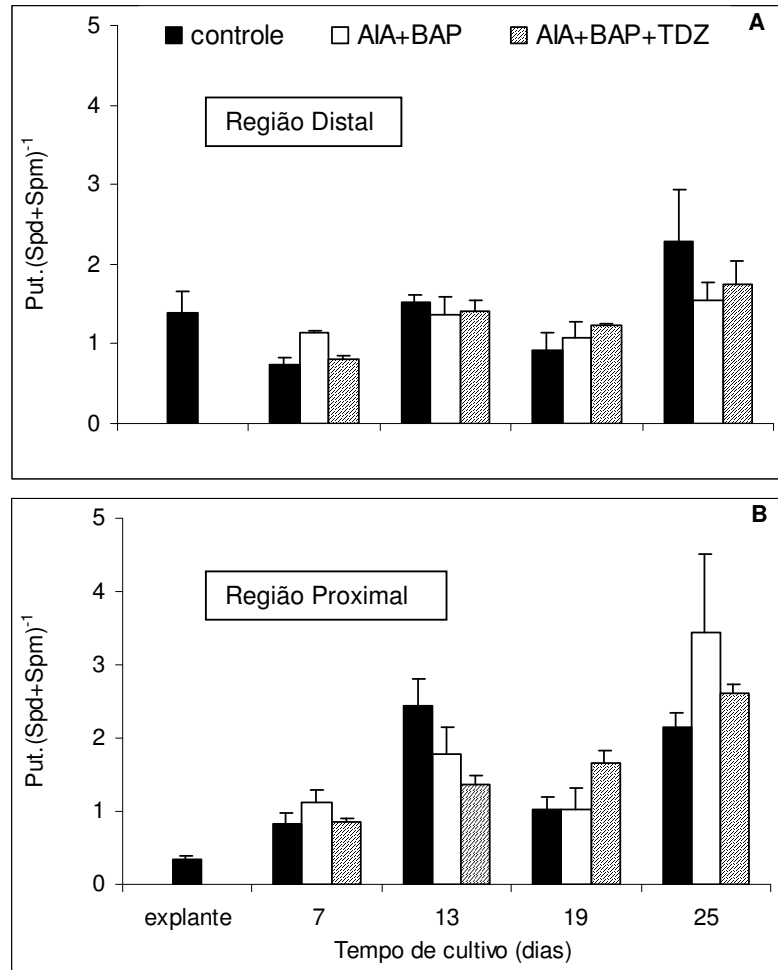


Figura 18. Razão de PAs [Put.(Spd+Spm)<sup>-1</sup>] na região distal (A) e proximal (B) de explantes de hipocótilos, durante o cultivo *in vitro*, em diferentes meios de cultura (média  $\pm$  desvio padrão; n=3).

### **3.3 Efeito de vitaminas e aminoácidos na morfogênese de explantes cotiledonares e conteúdo de PAs**

#### **3.3.1 Padrão morfogenético**

Com relação ao padrão morfogenético dos explantes cotiledonares cultivados *in vitro*, destaca-se que:

- a) Nos explantes distais e proximais mantidos nos tratamentos MB e MS, as primeiras respostas morfogenéticas foram visualizadas após 13 dias de cultivo. A partir desse período, manteve-se, em ambos os tratamentos, o mesmo padrão de desenvolvimento, observando-se após os 19 dias de cultura, abundantes protuberâncias compactas e esverdeadas, ao lado de calos friáveis e esbranquiçados. Também ocorreu o desenvolvimento de algumas estruturas fasciadas e outras semelhantes a pequenos brotos. Aos 28 dias de cultivo, observou-se algumas neoformações indiretas e abundantes calos, tanto nas regiões distais como nas proximais.
- b) A transferência dos explantes ao novo meio promoveu, em todas as culturas o crescimento e a proliferação de brotações, que às vezes alcançaram 1-2 cm, após um período aproximado de cinco semanas de cultura nestas condições.

#### **3.3.2 Padrão e conteúdo de PAs**

Durante o processo organogenético, foi avaliada a variação no conteúdo de PAs totais, na sua forma livre e conjugada, e a razão de PAs, nas regiões distais e proximais de explantes cotiledonares cultivados *in vitro*.

Com relação à variação das PAs totais (Figura 19A e B), os principais resultados foram:

- a) A região distal dos explantes apresenta quase o dobro de PAs totais que a região proximal.
- b) No início da cultura ocorreu um decréscimo no conteúdo de PAs totais (Figura 19), atingindo aos sete dias níveis semelhantes nas duas regiões, tanto nas cultivadas no tratamento MB como no MS.
- c) A partir dos sete dias, no tratamento MB, ocorreu uma redução que foi mais acentuada nos explantes distais (Figura 19A) que nos proximais (Figura 19B). No tratamento MS, esta redução ocorreu aos 21 dias nos explantes distais (Figura 19A), e aos 28 dias de cultivo nos proximais (Figura 19B).
- d) Em geral, ao longo da cultura, o conteúdo de PAs mostrou diferenças significativas nos explantes distais (Figura 19A) cultivados no tratamento MB em relação a aqueles no tratamento

MS, especialmente no período de 13 a 21 dias em cultura. Ao contrario, nos proximais (Figura 19B) o efeito do tratamento no conteúdo endógeno de PAs totais foi menos evidente.

e) Adicionalmente, o tratamento MS mostrou um efeito sobre o conteúdo de PAs totais, mantendo níveis maiores que aqueles observados no tratamento MB, especialmente durante a fase de expressão da morfogênese.

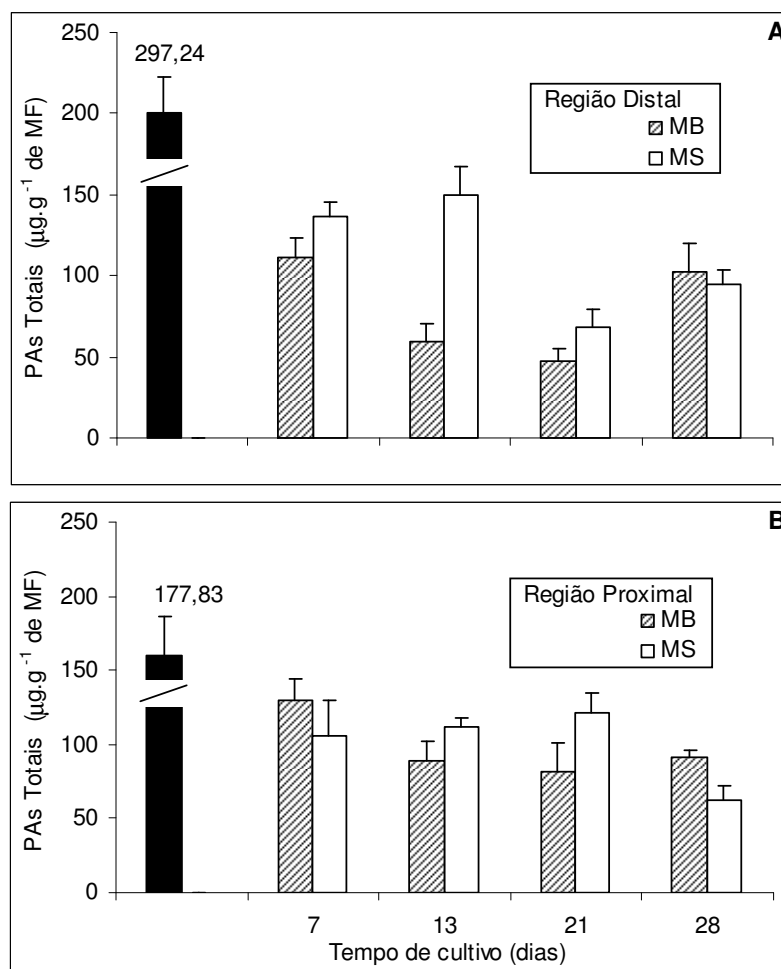


Figura 19. Variação do conteúdo endógeno de PAs totais, originais da região distal (A) e proximal (B) de explantes cotiledonares, durante o cultivo *in vitro* em meio de cultura MB e MS (média  $\pm$  desvio padrão; n=3).

Com relação à variação das PAs livres (Figura 20), os principais resultados foram:

a) A Spd (Figura 20B) foi a PA livre mais abundante em ambos os tratamentos, tanto em explantes distais quanto proximais. A Put (Figura 20A) apresentou níveis intermediários e a Spm (Figura 20C) os menores.

b) Nos tratamentos MB e MS, aos sete dias de cultivo, os níveis da Put livre (Figura 20A) decresceram acentuadamente enquanto os de Spd (Figura 20B) e Spm (Figura 20C)

mostraram os níveis mais altos. A partir do 13<sup>o</sup> dia de cultivo houve uma redução de todas as PAs livres, que se manteve até o final da cultura.

c) Destaca-se que, tanto os teores de Put (Figura 20A) como de Spd livre (Figura 20B) aos 28 dias de cultura são menores aos ocorridos nos explantes originais, enquanto a Spm (Figura 20C) é a única PA livre que mostrou teores maiores aos iniciais.

d) Em geral, não foi observada uma diferença significativa nos teores de Put, Spd e Spm livres ao comparar as duas regiões do explante mantidas num mesmo tratamento. Entretanto, ao comparar entre tratamentos, os níveis de Put e Spd nos explantes cultivados no tratamento MB mostraram uma tendência de decréscimo mais acentuada que aqueles mantidos no tratamento MS.

Com relação à variação de cada uma das PAs conjugadas (Figura 21), os principais resultados foram:

a) A Put conjugada (Figura 21A) foi a PA predominante, caracterizando o padrão de variação das PAs totais, seguida da Spm (Figura 21C) e da Spd conjugadas (Figura 21B).

b) Os níveis da Put conjugada (Figura 21A), aos sete dias de cultivo, nos explantes distais e proximais em ambos os tratamentos, foram semelhantes. A partir dos 13 até os 21 dias de cultura, ocorreu uma diminuição da Put, especialmente nos explantes distais do tratamento MB em relação àqueles mantidos no tratamento MS. Esta diferença entre tratamentos não foi observada para os explantes proximais, no entanto no tratamento MB, a região distal mostrou níveis significativamente menores de Put que a região proximal.

c) Destaca-se que, em geral, aos 28 dias de cultivo, nas duas regiões, os níveis de Put apresentaram valores semelhantes aos ocorridos aos sete dias de cultura, independente do tratamento (Figura 21A).

d) Os níveis de Spd (Figura 21B), aos sete dias de cultura diminuíram acentuadamente, nas duas regiões cultivadas tanto no tratamento MB como no MS. Porém, a partir dos 13 dias, nas duas regiões do explante mantidas nos tratamentos MB e MS, os valores de Spd aumentaram, com níveis maiores no tratamento MS. Ao final da cultura, no tratamento MB ainda ocorreu um aumento dos teores de Spd, enquanto que no tratamento MS a Spd não foi detectada.

e) Os níveis de Spm (Figura 21C), nos tratamentos MB e MS aumentaram durante cultura em relação aos valores iniciais. Este acréscimo foi mais acentuado no tratamento MS, especialmente aos 13 e 21 dias de cultivo. Ao final da cultura os valores desta PA foram semelhantes nas duas regiões, independentemente do tratamento.

f) Finalmente, ao compararem-se os níveis das respectivas PAs nas formas livres e conjugadas, resulta que a Spd (Figura 20B) livre é predominante sobre a forma conjugada (Figura 21B), para ambos os tratamentos, especialmente durante o período inicial da cultura,

enquanto que, a fase final do cultivo foi associado a níveis de Put e Spm conjugadas (Figura 21A e B) maiores aos da forma livre. Além disso, no tratamento MB, ao final da cultura, a Put livre, e a Spd livre e conjugada, foram menores em relação aos valores originais, enquanto os teores de Spm, nas formas livre e conjugada, foram maiores. Os teores de Put conjugada, não mostraram uma diferença significativa entre os valores ocorridos ao início e fim da cultura. Destaca-se que, em ambos os tratamentos, ao início da cultura a PA predominante era a Put livre, enquanto ao final da cultura foi a Put conjugada.

Quanto à variação da relação de PAs (Figura 22), verificou-se que a razão de PAs inicial, nos explantes, diminuiu drasticamente após o início das culturas, mantendo se neste patamar durante todo o período de cultivo. Para todos os tratamentos, o conteúdo de Put, na forma livre mais a forma conjugada, foi sempre maior ao das outras PAs analisadas, resultando numa relação de PAs sempre maior o igual que 1,0.

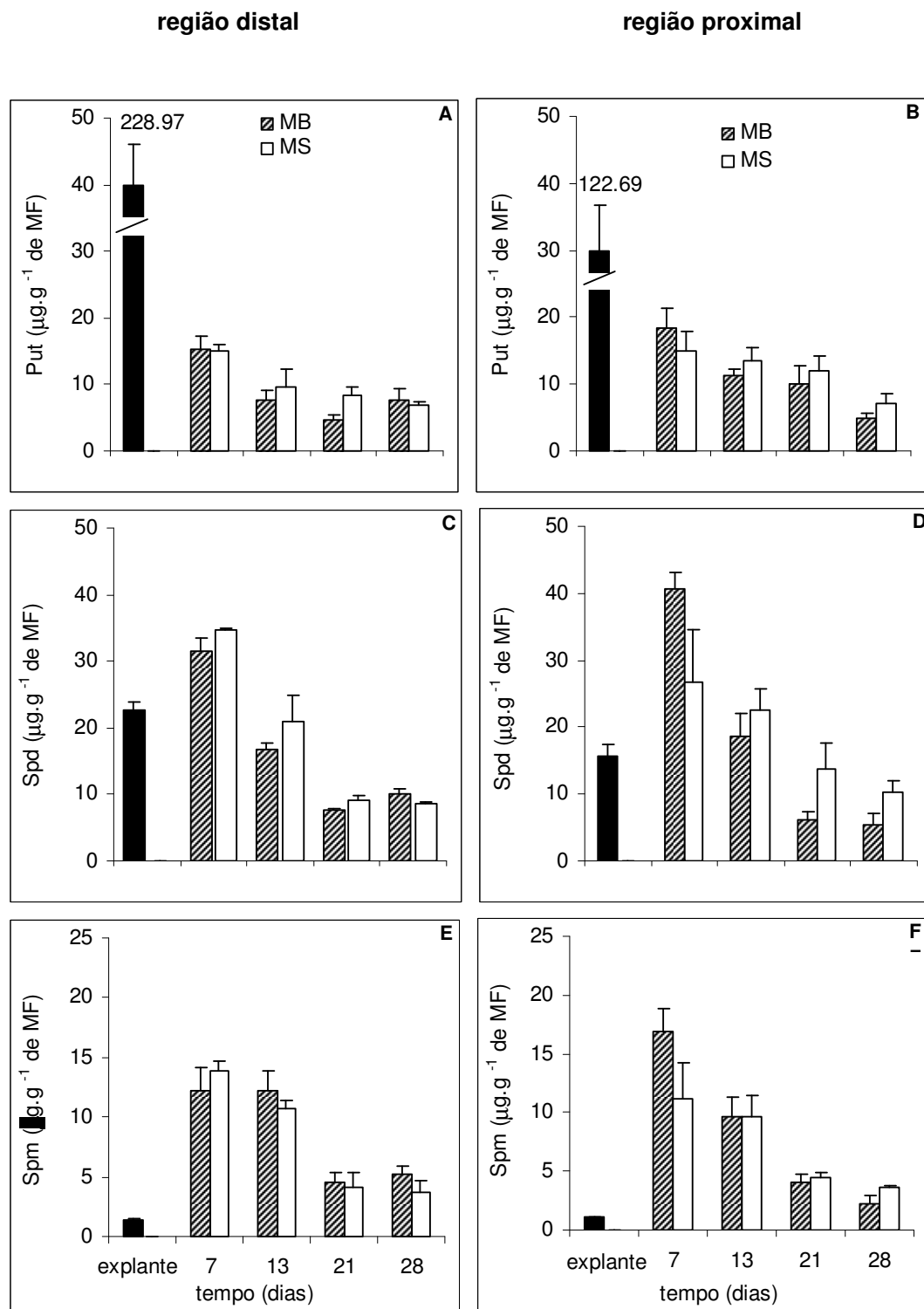


Figura 20. Variação no conteúdo endógeno das PAs livres, na região distal (A, C, E) e proximal (B, D, F) de explantes cotiledonares, durante o cultivo *in vitro* em diferentes meios de cultura (média  $\pm$  desvio padrão; n=3) (notar a escala diferente para Spm).

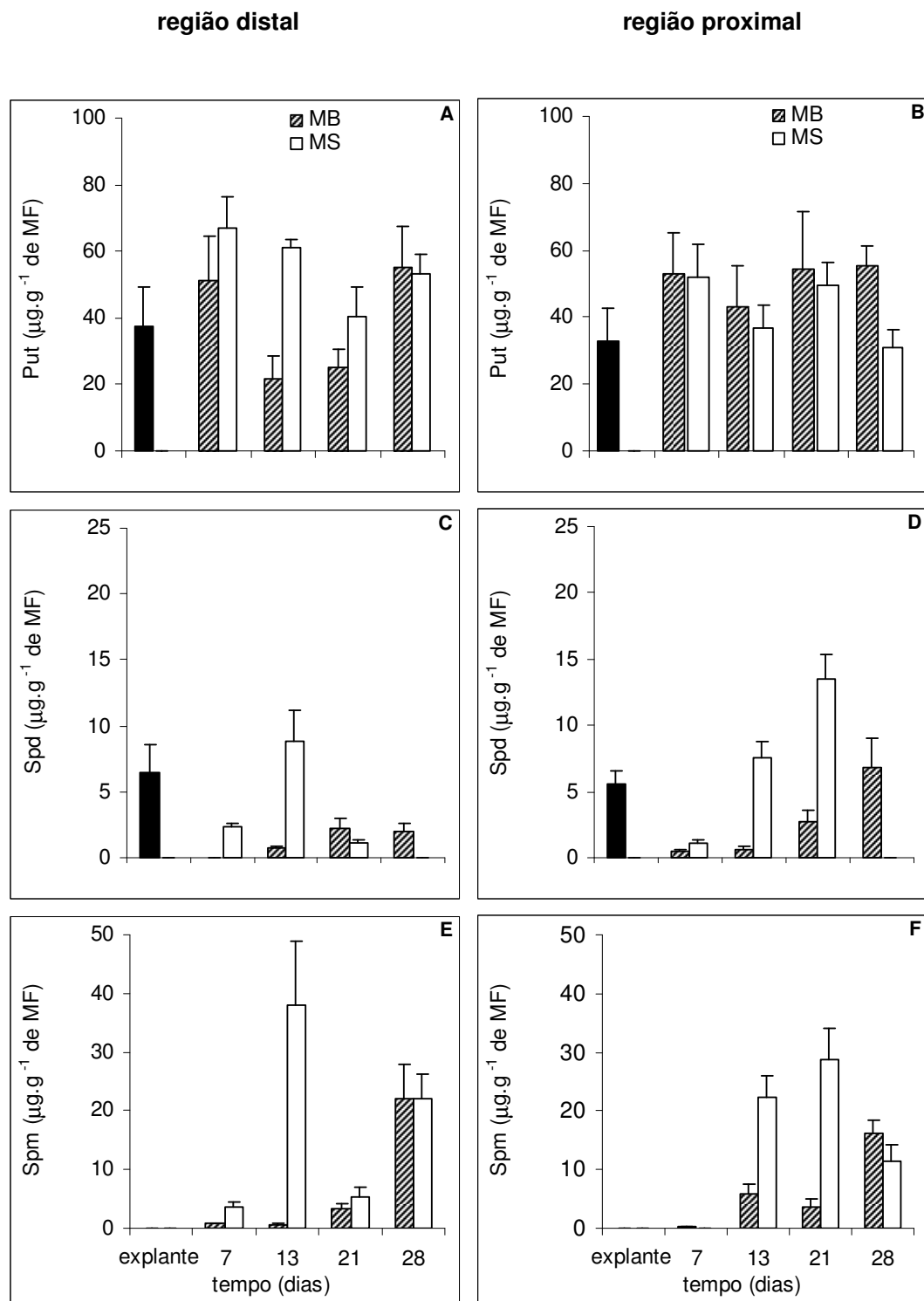


Figura 21. Variação no conteúdo endógeno das PAs conjugadas, da região distal (A, C, E) e proximal (B, D, F) de explantes cotiledonares, durante o cultivo *in vitro* em diferentes meios de cultura (média  $\pm$  desvio padrão; n=3) (notar a escala diferente para todas as PAs).



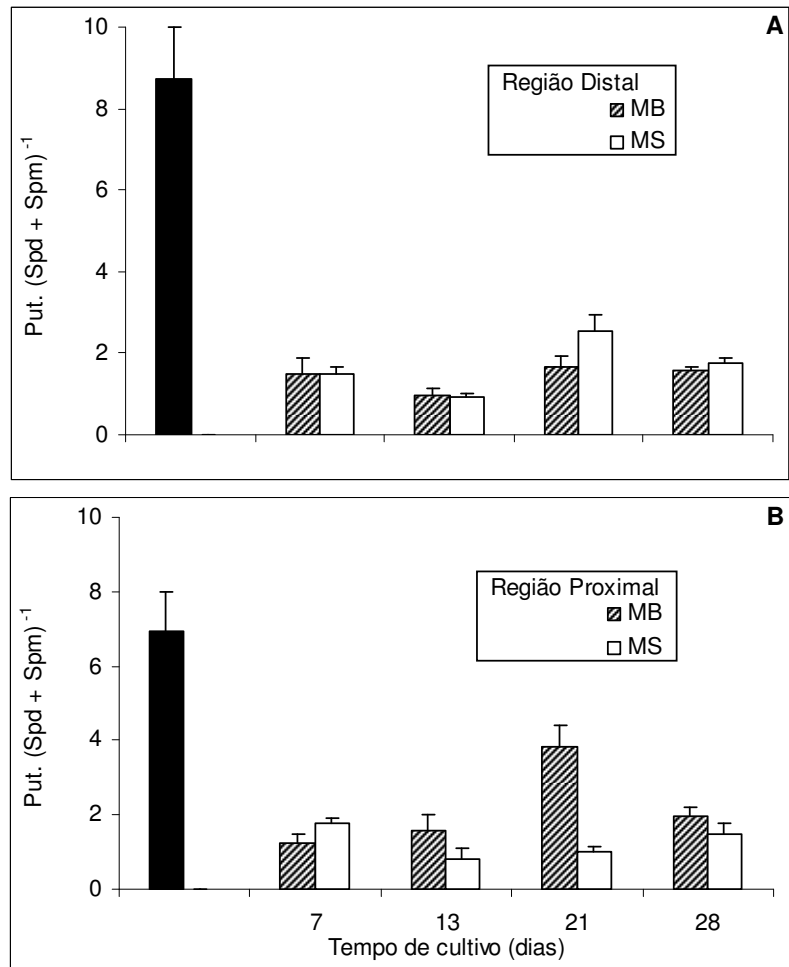


Figura 22. Razão de PAs [Put.(Spd+Spm)<sup>-1</sup>], nas regiões distal (A) e proximal (B) de explantes cotiledonares, e durante o cultivo *in vitro* em meio de cultura MB e MS (média  $\pm$  desvio padrão; n=3).

### 3.4 Efeito de PAs exógenas no conteúdo de PAs endógenas e nas respostas morfológicas em explantes de cotilédones

#### 3.4.1 Organogênese

##### 3.4.1.1 Padrão morfológico

Com relação ao padrão morfológico dos explantes cotiledonares cultivados *in vitro* por 28 dias, foram observadas diferenças significativas na morfologia dos explantes em cultura organogênica quando mantidos nos diferentes tratamentos (Figura 23). Salientam-se os seguintes resultados:

- Os explantes mantidos no tratamento controle (Figura 23, A e E) caracterizaram-se pela formação de protuberâncias esverdeadas, estruturas fasciadas formadas a partir dos calos, e de algumas brotações indiretas. Esta resposta foi mais acentuada nas regiões proximais.
- O tratamento Put (Figura 23, B e F) favoreceu principalmente a proliferação de calo, com o conseqüente aumento de tamanho dos explantes. Neste tratamento as protuberâncias foram menos evidentes que no tratamento controle, mas mesmo assim, foram visualizadas brotações indiretas, especialmente na região proximal.
- Os explantes distais mantidos no tratamento Spd (Figura 23, C e G), apresentaram uma morfologia semelhante ao controle, mostrando abundantes protuberâncias. No entanto, a região proximal se caracterizou pela maior proliferação de calo de aspecto friável, e a partir destes, o desenvolvimento de estruturas semelhantes a pequenas folhas.

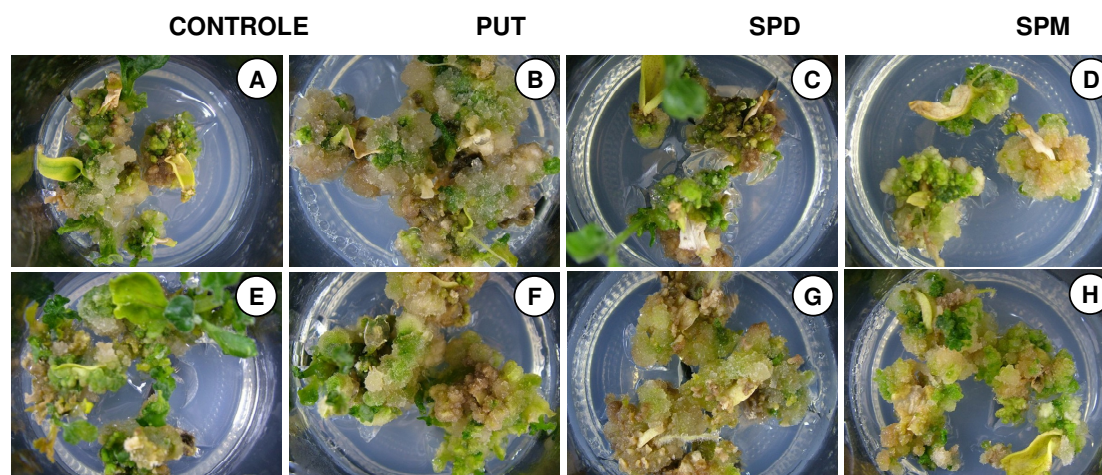


Figura 23. Efeito da aplicação de PAs exógenas às culturas organogênicas de cotilédones, região distal e proximal, cultivadas *in vitro*. Tratamento Controle: região distal (A), região proximal (E); Tratamento Put: região distal (B), região proximal (F); Tratamento Spd: região distal (C); região proximal (G); Tratamento Spm: região distal (D); região proximal (H).

d) Nas duas regiões dos explantes mantidos no tratamento Spm (Figura 23, D e H), foram visualizadas pequenas estruturas alongadas semelhantes a gemas, através de organogênese indireta. Esta resposta foi mais acentuada na região proximal, a qual também apresentou maior crescimento dos explantes junto com calo mais esverdeado, em relação à região distal. Em relação aos controles ocorreu maior proliferação de calo.

#### **3.4.1.2 Padrão e conteúdo de PAs**

Durante o processo organogenético foi avaliada a variação no conteúdo de PAs, nas suas formas livres e conjugadas, e a razão de PAs, nas regiões distais e proximais de explantes cotiledonares cultivados *in vitro*.

Com relação à variação de PAs livres (Figura 24, A e B) para ambas as regiões cotiledonares cultivadas *in vitro*, os principais resultados foram:

- a) Nos explantes distais e proximais cultivados no tratamento controle, os níveis de Put diminuíram acentuadamente aos sete dias de cultivo, seguido de pequena redução até o final da cultura. Os níveis endógenos de Spd e Spm, após aumentar seus teores aos sete dias, decresceram gradativamente até o final do cultivo.
- b) A adição de Put as culturas organogênicas só foi efetiva na manutenção de teores altos da respectiva PA aos sete dias de cultivo (Figura 24, A e B), resultando ser a PA predominante, seguida da Spd e Spm. A partir dos sete dias, o padrão de variação de todas as PAs livres e, os valores de Spd e Spm foram similares aos observados nos controles.
- c) O tratamento Spd só aumentou os teores endógenos dessa PA aos sete dias de cultivo nas duas regiões do explante (Figura 24, A e B), decrescendo nas demais fases da cultura.
- d) A adição de Spm ao meio de cultura (Figura 24, A e B), promoveu altos teores dessa PA endógena a partir dos sete dias, e especialmente aos 21 dias de cultivo, e elevou também o teor de Put endógena durante todo o experimento. Os padrões de variação da Put e Spd, e os valores desta última, não mostraram diferenças quando comparados ao controle.
- e) Em geral, não houve diferenças significativas entre os valores de PAs endógenas das regiões distais e proximais.

Com relação à variação das PAs conjugadas, nos explantes distais (Figura 25A) e proximais (Figura 25B), os principais resultados foram:

- a) Nos controles, a região distal apresentou maiores conteúdos de PAs, que aumentaram durante a cultura, especialmente a Put e a Spm.

- b) Nas regiões distal e proximal, a adição de Put de uma maneira geral aumentou seus respectivos valores endógenos em relação ao controle, e provocou uma queda nas demais PAs, especialmente na Spm, que ficou muito abaixo do seu teor nos controles.
- c) A adição de Spd promoveu um pequeno aumento no seu teor endógeno e uma queda nas demais PAs conjugadas.
- d) A adição de Spm ao meio de cultivo elevou seu teor endógeno aos 21 dias na região proximal dos explantes, e provocou uma diminuição aos 28 dias de cultura em relação aos controles, tanto na região proximal como na distal, e causou uma queda nos teores de Put.
- e) Finalmente, destaca-se que em todos os tratamentos a Put foi a PA conjugada mais abundante, mesmo quando adicionadas PAs exógenas. Além disso, ao compararem-se os níveis de Put, Spd e Spm livres (Figura 24, A, B e C) e conjugadas (Figura 25, A, B e C), para todos os tratamentos verificou-se que ao início da cultura os valores de Spd livre predominaram sobre os da forma conjugada e, ao final do cultivo, os conteúdos de Put e Spm conjugadas foram maiores aos ocorridos na forma livre.

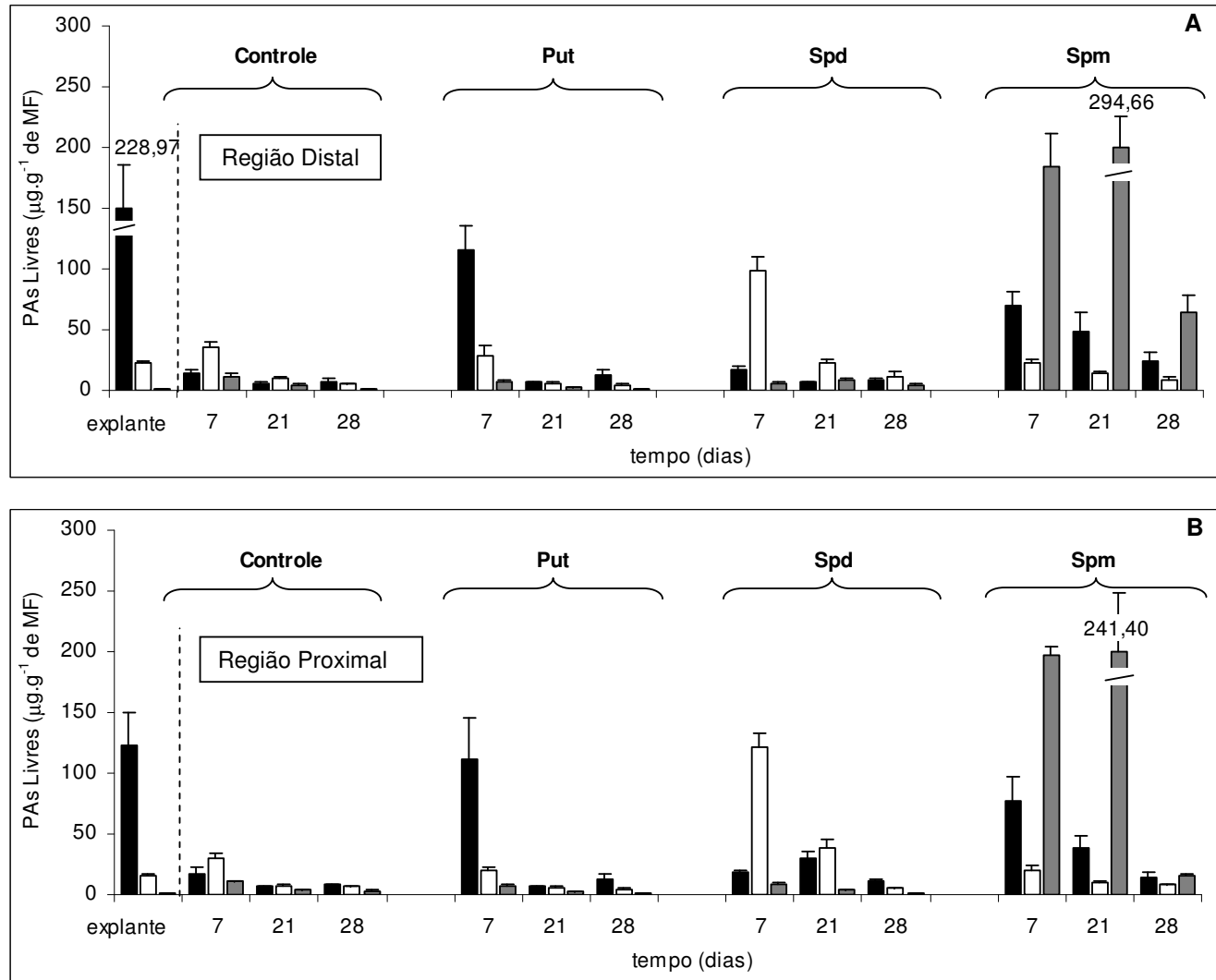


Figura 24. Efeito da adição de PAs nos níveis endógenos das diferentes PAs livres (■-Put, □-Spd, ▨-Spm), na região distal (A) e proximal (B) de explantes cotiledonares, durante o cultivo *in vitro* em meio de cultura organogênico. (média  $\pm$  desvio padrão; n=3).

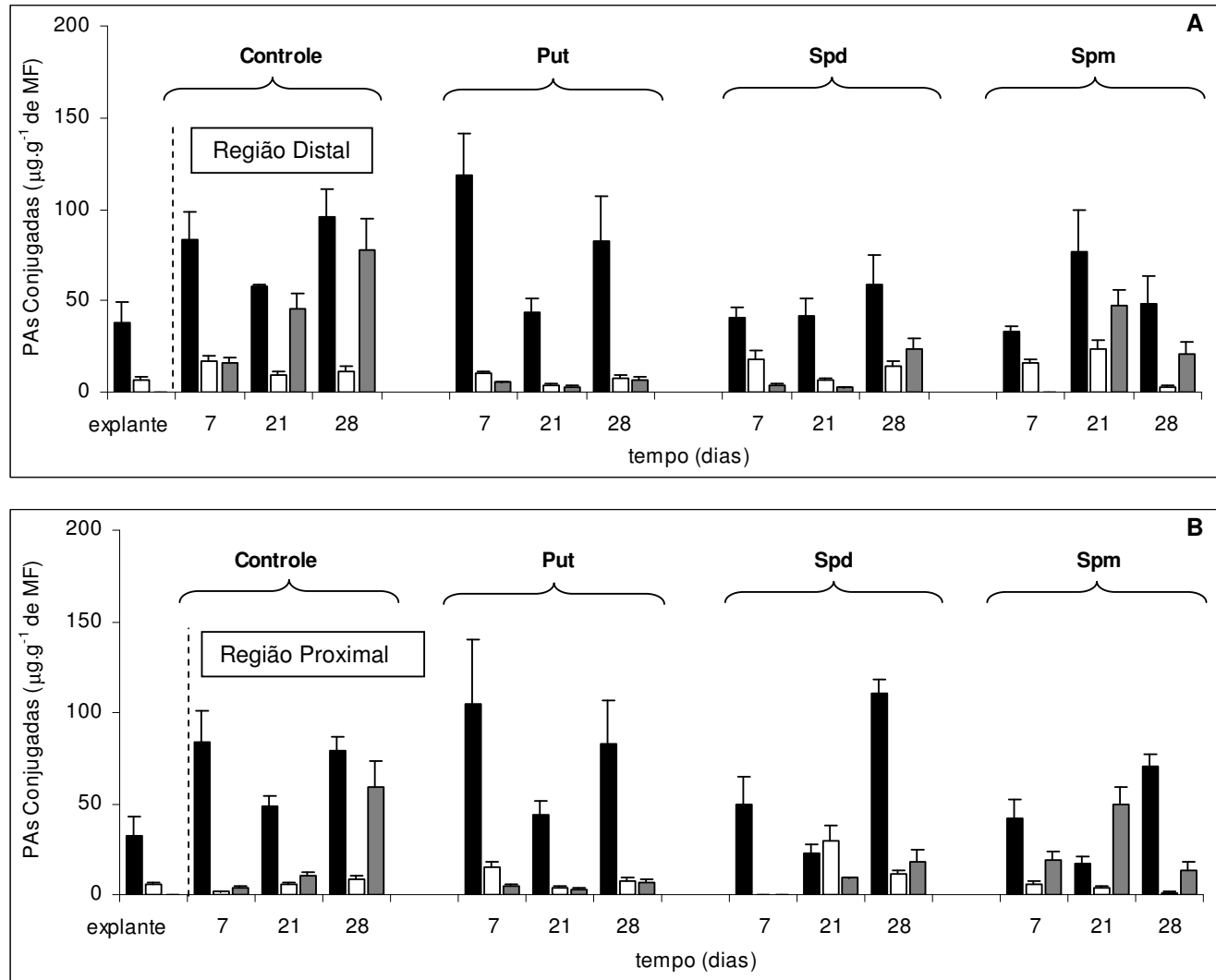


Figura 25. Efeito da adição de PAs nos níveis endógenos das diferentes PAs conjugadas (■-Put, □-Spd, ▨-Spm), na região distal (A) e proximal (B) de explantes cotiledonares, durante o cultivo *in vitro* em meio de cultura organogênico. (média  $\pm$  desvio padrão; n=3).

Com relação à razão de PAs (Figura 26A e B) para ambas as regiões cotiledonares cultivadas *in vitro*, os principais resultados foram:

- A razão inicial diminuiu durante cultura em todos os tratamentos. Porém, a adição de Put ao meio de cultura provocou uma relação muito maior nas duas regiões do explante, em relação a todos os tratamentos. O tratamento controle, de uma maneira geral, manteve valores intermediários, até 21 dias de cultivo, especialmente nos explantes proximais.
- Tanto a adição de Spd como de Spm ao meio, diminuíram a relação até os 13 dias de cultivo nas duas regiões, enquanto que provocou um aumento ao final da cultura nos proximais.

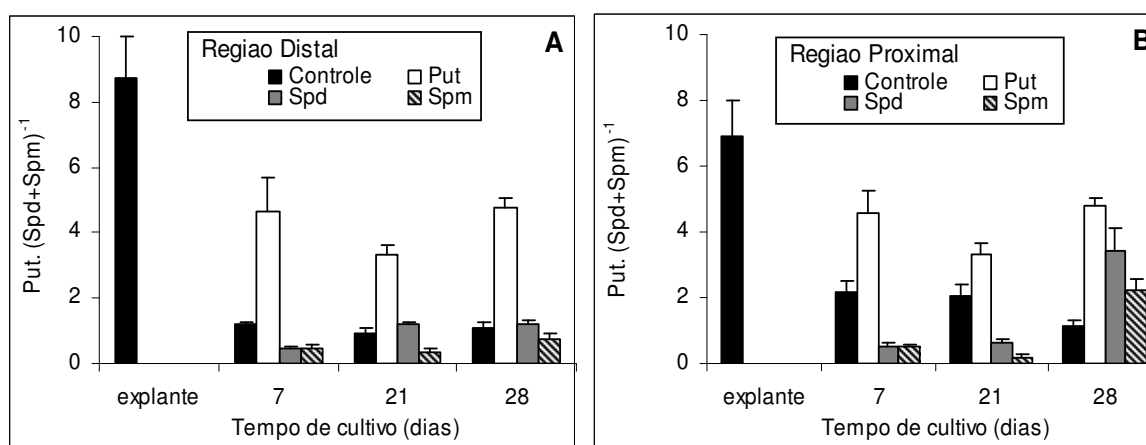


Figura 26. Razão de PAs [ $\text{Put} \cdot (\text{Spd} + \text{Spm})^{-1}$ ] nas regiões distal (A) e proximal (B) de explantes cotiledonares, durante o cultivo *in vitro* em meio de cultura organogênico adicionado com diferentes PAs exógenas (média  $\pm$  desvio padrão; n=3).

### 3.4.2 Embriogênese somática

#### 3.4.2.1 Padrão morfológico

Com relação à resposta morfológica dos explantes cotiledonares cultivados *in vitro*, destaca-se que:

a) Aos 35 dias de cultivo não foram observadas diferenças significativas na capacidade de regeneração entre as diferentes regiões dos explantes (Figura 27). Entretanto, nos controles, os explantes proximais (Figura 27E) mostraram uma proliferação mais abundante de calos que os distais (Figura 27A), e esta resposta foi ainda mais acentuada nos tratamentos Put (Figura 27, B e F) e Spd (Figura 27, C e G).

b) Em geral, em todos os tratamentos nos quais foi adicionada uma PA exógena (Figura 27) observou-se um maior tamanho dos explantes. Apesar disso, nenhum destes tratamentos foi significativamente diferente ao controle (Figura 28), em relação ao número de embriões totais visualizados em cada explante. Porém, a adição de Put exógena afetou o número de embriões nos explantes distais e proximais, que foi significativamente diferente em relação ao tratamento Spd. Neste último tratamento ocorreram os menores números de embriões somáticos.

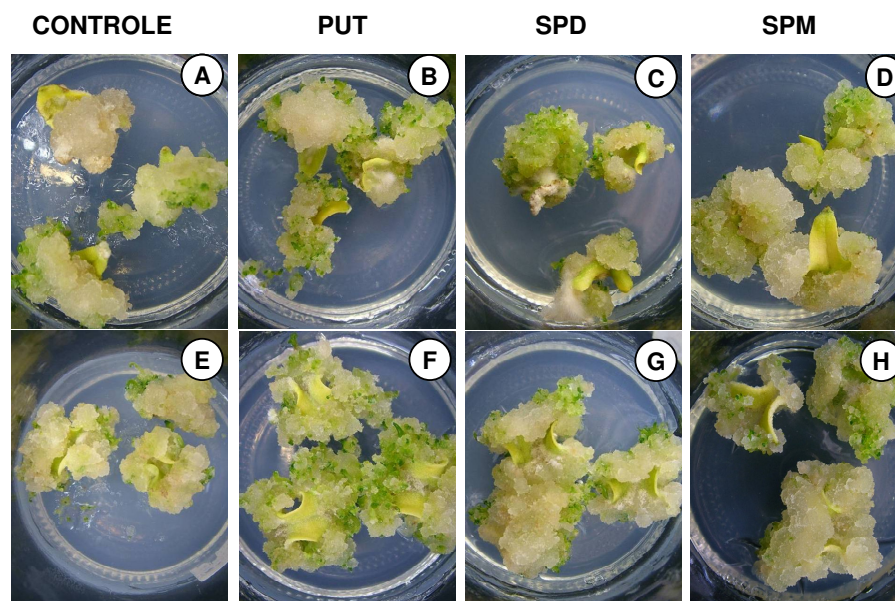


Figura 27. Efeito da aplicação de PAs exógenas nas culturas embriogênicas de cotilédones, região distal e proximal, cultivadas *in vitro*. Tratamento Controle: região distal (A), região proximal (E); Tratamento Put: região distal (B), região proximal (F); Tratamento Spd: região distal (C); região proximal (G); Tratamento Spm: região distal (D); região proximal (H).



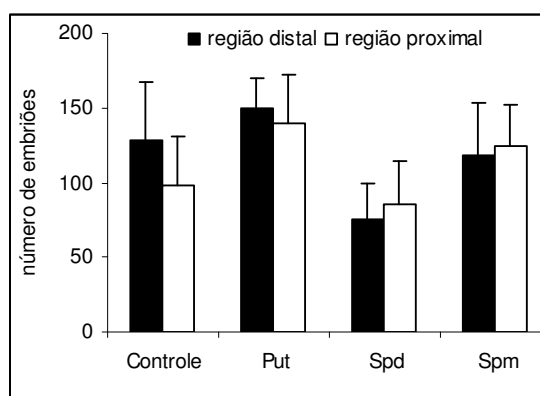


Figura 28. Número de embriões observados na região distal (■) e proximal (□) de explantes cotiledonares, durante cultivo *in vitro* em meio de cultura embriogênico. (média ± desvio padrão; n=5).

### 3.4.2.2 Padrão e conteúdo de PAs

Durante o processo embriogênico, foi avaliada a variação no conteúdo de PAs, nas suas formas livres e conjugadas, e a razão de PAs, nas regiões distais e proximais de explantes cotiledonares cultivados *in vitro*, em meios com e sem adição de PAs exógenas.

Com relação à variação de PAs livres (Figura 29, A e B) para ambas as regiões cotiledonares cultivadas *in vitro*, os principais resultados foram:

- a) No tratamento controle, em ambas as regiões, o nível de Put decresceu ao longo da cultura, enquanto os valores de Spd e Spm aumentaram significativamente aos sete dias de cultivo, seguido de posterior redução até o final do experimento. Aos 28 dias de cultivo todos os valores de PAs eram próximos e muito baixos.
- b) No tratamento com a adição de Put, os valores dessa PA ficaram muito altos aos sete dias de cultivo, mas decresceram rapidamente já aos 21 dias de cultura nas duas regiões do explante. Neste tratamento, a partir dos sete dias, o padrão de variação de todas as PAs se manteve similar ao controle, não afetando os valores de Spd e Spm; porém, a Put foi a PA predominante, seguida da Spd e de Spm, durante todo o experimento.
- c) Com a adição de Spd ao meio de cultura (Figura 29, A e B), seus valores endógenos foram muito elevados aos sete dias, decrescendo ao longo do cultivo, mas mantendo níveis mais elevados que as demais PAs até os 28 dias de cultura. Este tratamento não afetou o padrão de variação nem os conteúdos endógenos de Spm nas duas regiões do explante. Entretanto, elevou o conteúdo endógeno de Put, a partir dos 21 dias, a níveis maiores aos observados nos controles.
- d) A adição de Spm ao meio de cultura (Figura 29, A e B) promoveu sua incorporação em altos níveis, que assim se mantiveram ao longo de todo o experimento, especialmente na região distal. Ocorreu ainda uma maior queda nos valores de Put e Spd quando comparados aos demais tratamentos.

Com relação à variação das PAs conjugadas (Figura 30, A e B), os principais resultados foram:

- a) Ao longo da cultura, em ambas as regiões cotiledonares, nos tratamentos controle e Put ocorreram valores endógenos maiores de Put e menores de Spm, enquanto a Spd praticamente desaparece. Tanto os níveis de Put quanto os de Spm aumentam quando comparados aos valores originais, porém a adição de Put elevou um pouco mais os níveis da respectiva PA sem afetar as demais PAs.
- b) Quando o meio de cultura foi suplementado com Spd (Figura 30, A e B), não há qualquer acúmulo de Spd conjugada. Pelo contrário, neste tratamento a Put conjugada foi a PA mais abundante. Nos explantes distais (Figura 30A), a adição de Spd elevou grandemente os valores de Put aos 21 dias de cultivo, enquanto nas regiões proximais (Figura 30B) diminuiu seus valores.

c) No tratamento Spm, a adição da respectiva PA resultou na incorporação de Spm conjugada, depois dos sete dias na região distal (Figura 30A), e já aos sete dias na região proximal (Figura 30B), decrescendo aos 28 dias nas duas regiões do explante. Os conteúdos de Put conjugada durante cultura foram semelhantes ao controle.

d) De maneira geral, não há grandes diferenças entre as regiões distal e proximal dos explantes, ocorrendo em todos os tratamentos um acúmulo de Put e Spm conjugadas, enquanto a Spd conjugada foi detectada só eventualmente.

e) Finalmente, destaca-se que, no controle, a partir do momento em que a Spd livre (Figura 29A e B) passa a ser a PA livre predominante, aos 21 dias de cultura, a Put conjugada (Figura 30A e B) foi a PA mais abundante entre as poliaminas livres e conjugadas. Entretanto, no tratamento Put, no qual a Put (Figura 29A e B) foi a PA livre predominante, a Put conjugada (Figura 30A e B) também foi a PA que apresentou os maiores níveis a partir dos 21 dias de cultivo. Nos tratamentos Spd e Spm, a Put conjugada deixa de ser a PA mais abundante, entre as PAs livres e conjugadas, particularmente devido ao drástico aumento da respectiva PA livre.

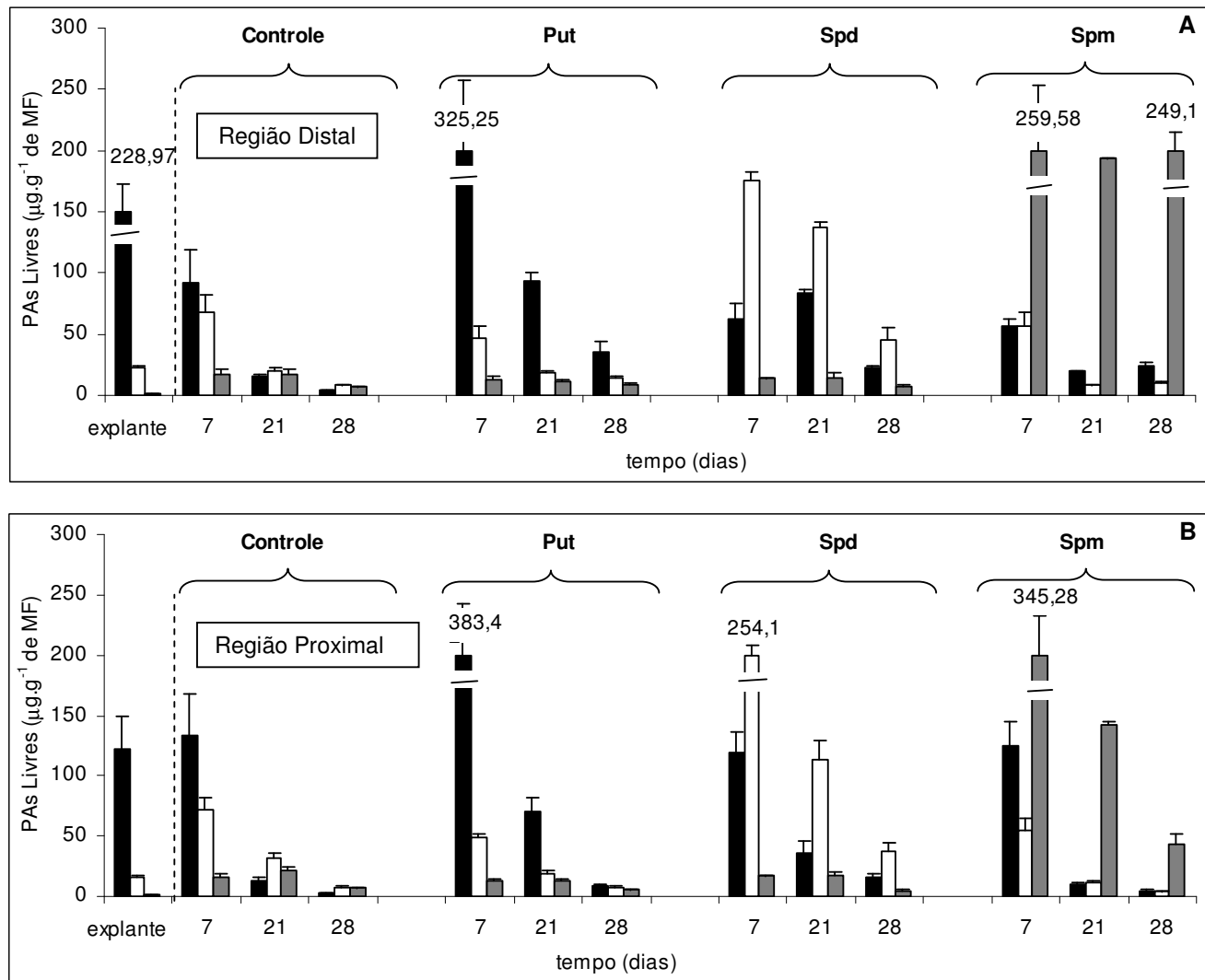


Figura 29. Variação no conteúdo endógeno das diferentes PAs livres (■-Put, □-Spd, ▨-Spm), na região distal (A) e proximal (B) de explantes cotiledonares, durante o cultivo *in vitro* em meio de cultura embriogênico. (média ± desvio padrão; n=3).

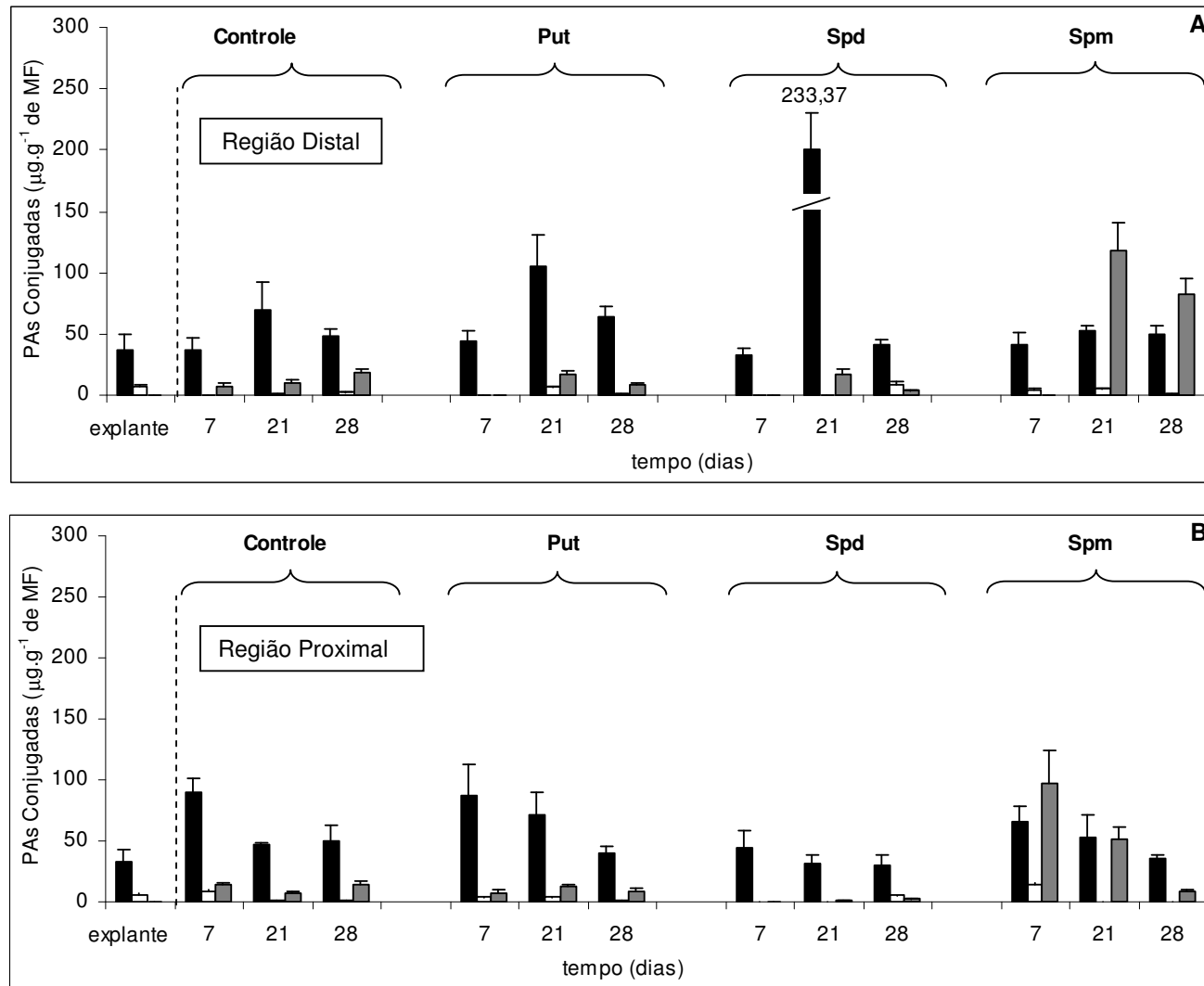


Figura 30. Variação no conteúdo endógeno das diferentes PAs conjugadas (■-Put, □-Spd, ▨-Spm), na região distal (A) e proximal (B) de explantes cotiledonares, durante o cultivo *in vitro* em meio de cultura embriogênico. (média ± desvio padrão; n=3).

Com relação à variação da razão de PAs (Figura 31, A e B), os principais resultados foram:

- Para as culturas mantidas no tratamento controle, a razão de PAs inicial diminuiu acentuadamente até os sete dias de cultivo, mostrando uma relação estável durante o resto do período em cultivo, com valores semelhantes para os explantes distais e proximais (Figura A e B).
- Nas culturas mantidas nos tratamentos Spd e Spm, a razão mostrou um decréscimo mais acentuado quando comparado ao controle, mantendo esse patamar até o final do experimento.
- Pelo contrário, o tratamento Put, aos sete dias de cultura manteve a razão inicial, com redução gradativa até o final da cultura, porém com uma razão maior que os outros tratamentos.

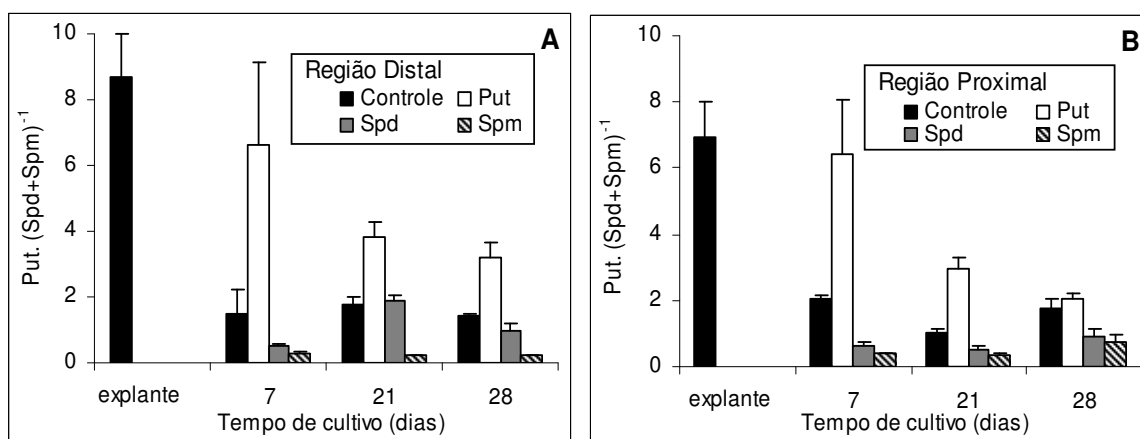


Figura 31. Razão de PAs [ $\text{Put} \cdot (\text{Spd} + \text{Spm})^{-1}$ ] nas regiões distal (A) e proximal (B) de explantes cotiledonares, durante o cultivo *in vitro* em meio de cultura embriogênico adicionado com diferentes PAs exógenas (média  $\pm$  desvio padrão; n=3).

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 O papel do tipo e região do explante, e do meio de cultura nas respostas morfogênicas

Em nosso trabalho, observou-se que a viabilidade e a capacidade de regeneração dos explantes de cotilédone de *S. melongena*, cv. Embú, foi dependente da suplementação de fitorreguladores ao meio de cultivo *in vitro*, enquanto que explantes de hipocótilo cultivados em meio sem adição de fitorreguladores mostraram regeneração organogênica. Para ambos os explantes, a adição de concentrações e combinações de diferentes fitorreguladores afetou a resposta morfogênica, tanto para ES quanto para OG. Ao suplementar-se o meio de cultivo com 26,85  $\mu\text{M}$  de ANA, tratamento adaptado às condições embriogênicas, os cotilédones mostraram uma maior competência para ES quando comparados aos hipocótilos. Particularmente, nos cotilédones, um tempo de 14 dias em meio indutor resultou no desenvolvimento precoce dos embriões somáticos após sua transferência para o meio sem fitorreguladores, quando comparado aos explantes mantidos no tratamento com ANA durante todo o período de cultivo. Por outro lado, nas combinações de 2,9  $\mu\text{M}$  de AIA e 11,1  $\mu\text{M}$  de BAP, ou 2,9  $\mu\text{M}$  de AIA, 11,1  $\mu\text{M}$  de BAP e 0,2  $\mu\text{M}$  TDZ, utilizadas para a organogênese, o potencial organogênico dos cotilédones foi menor em relação aos explantes de hipocótilo. Tanto nos explantes de cotilédone como de hipocótilo, a resposta morfogênica foi semelhante entre as regiões distal e proximal. Destaca-se que a adição de TDZ ao meio organogênico provocou um aumento na resposta em relação à adição de AIA e BAP, promovendo a formação de protuberâncias nos cotilédones, e calos e gemas nos hipocótilos.

Segundo Sharma e Rajam (1995a), a combinação de 2,9  $\mu\text{M}$  de AIA e 11,1  $\mu\text{M}$  de BAP, mostrou-se mais eficiente na organogênese a partir de explantes de cotilédone e hipocótilo de *S. melongena*, cv. Pusa Purple Long. Porém, quando esta combinação foi utilizada no presente trabalho com *S. melongena*, cv. Embú, as respostas morfogênicas discordaram daquelas obtidas por estes autores. Salienta-se que, para os cotilédones, esta combinação resultou numa evolução organogênica indefinida, observando-se principalmente protuberâncias. Por outro lado, apesar de verificar-se a conversão esporádica das protuberâncias a gemas após um período prolongado em cultura, com eventual regeneração de ramos em meio sem adição de fitorreguladores, não ocorreu o enraizamento destes. Assim, demonstrou-se que esta combinação ou concentrações de fitorreguladores adaptadas às condições organogênicas e material utilizado foi inadequada, expondo, possivelmente, às células a um estresse, conforme salientado por Gaspar et al. (2002). Para os hipocótilos, a resposta foi semelhante àquela ocorrida em meio de cultivo *in vitro* sem a adição de fitorreguladores.

Apesar da combinação utilizada não ter resultado numa evolução organogenética similar àquela observada por Sharma e Rajam (1995a), em geral, as diferenças na habilidade morfogenética tanto para ES quanto para OG entre os explantes de cotilédone e hipocótilo de *S. melongena*, cv. Embú, foram semelhantes. Diferentemente, Magioli et al. (1998) obtiveram em *S. melongena*, cv. F-100, um maior potencial de regeneração nos cotilédones que os hipocótilos, com o uso isolado de 0,2  $\mu$  M de TDZ, em comparação à resposta induzida por BAP. Em nosso trabalho, a aplicação de TDZ ao meio organogênico AIA+BAP não modificou o potencial de regeneração entre os explantes, mas somente aumentou a formação das estruturas induzidas pela combinação do AIA e BAP. Pode-se supor que, em parte, o efeito do TDZ adicionado em cultura *in vitro*, simule aqueles provocados pela adição da auxina e citocinina (Murthy et al., 1998). Ainda nesse sentido, o TDZ provocou uma inibição sobre o desenvolvimento dos ramos nos hipocótilos, semelhante ao relatado por Magioli et al. (1998).

#### **4.2 Conteúdo e variação de poliaminas em explantes e culturas**

A partir das diferenças observadas na capacidade morfogenética entre explantes, pôde-se verificar a existência de uma possível relação desse processo com os conteúdos endógenos de PAs nos explantes iniciais. Assim, os maiores conteúdos endógenos de Put livre e conjugada, Spd livre, e PAs totais apresentados nos cotilédones em comparação aos hipocótilos, foi correlacionado com a competência para ES. Ao contrário, os baixos níveis de PAs nas formas livre e conjugada observados nos hipocótilos foram associados a uma maior capacidade organogenética. Acrescenta-se que, nos cotilédones, a Put foi a PA mais abundante, seguida da Spd, enquanto que, nos hipocótilos, os conteúdos destas PAs não diferiram significativamente. Os conteúdos de Spm foram muito baixos e semelhantes nos dois tipos de explantes. Além disso, as PAs na forma livre foram predominantes sobre a forma conjugada. Os maiores conteúdos de Put livre na região distal de cotilédones e hipocótilos em relação à região proximal não foram relacionados com a habilidade morfogenética. Entretanto, sugerem estar positivamente relacionados com os maiores conteúdos de aminoácidos totais ocorridos nestas regiões dos explantes (De Souza, 2006).

Diferenças nos conteúdos endógenos de PAs entre diferentes explantes num mesmo programa morfogenético (Boget et al., 1995) ou de um gradiente de PAs no mesmo explante, relacionados com a habilidade morfogenética (Altamura et al., 1993; Sharma e Rajam, 1995b) já foram relatadas anteriormente. Tiburcio et al. (1988) correlacionaram os menores conteúdos de PAs observados em internós de inflorescência (estágio de fruto verde) de *Nicotiana tabacum* com a maior habilidade organogenética. Por outro lado, a maior capacidade embriogênica tem sido correlacionada positivamente aos valores de PAs iniciais a partir de explantes de hipocótilo e cotilédone de *S. melongena*, cv. Pusa Purple Long (Sharma e Rajam,



1995b; Yadav e Rajam, 1997). No entanto, Pedroso et al. (1997) observaram em folhas de *Camellia japonica* que tanto as regiões embriogênicas como as não embriogênicas não apresentaram diferenças nos conteúdos de PAs iniciais. Segundo Antognoni et al. (1998), as diferenças nos conteúdos de PAs entre diferentes tecidos poderiam estar associadas a um metabolismo inicial diferente. Neste sentido, mais do que seus conteúdos, o fator determinante na morfogênese *in vitro* poderia ser o metabolismo das PAs (Aribaud et al., 1999). Porém, em nossos experimentos, tanto os conteúdos, como a variação de PAs livres e conjugadas em culturas organogênicas *in vitro*, a partir de diferentes tipos de explantes, indicam uma associação destas PAs com o programa organogenético.

Em geral, no início das culturas *in vitro* (até sete dias), durante o período de indução organogenética, baixos conteúdos de Put livre, que eram semelhantes nos dois tipos de explantes, foram associados com um acréscimo nos teores de Put conjugada que se manteve ao longo da cultura. Em relação aos valores originais, um decréscimo acentuado nos valores da Put livre foi associado com uma diminuição no conteúdo de PAs totais, nas duas regiões dos cotilédones, enquanto que nos hipocótilos, com baixos conteúdos iniciais, mostraram um aumento das PAs totais devido ao acréscimo das PAs conjugadas. Nesse período, a Spd e Spm livres foram predominantes sobre a forma conjugada, devido a um aumento acentuado nos teores iniciais, aos sete dias de cultura, independentemente do tratamento. Assim, nossos resultados sugerem que uma relação desfavorável na razão entre a Put livre e as PAs Spd e Spm livres no início da cultura, junto com um acréscimo na conjugação da forma livre de Put, tanto nos cotilédones como nos hipocótilos, poderiam estar relacionados à fase indutiva do processo organogênético. Reforçando esta hipótese, em cotilédones sem uma resposta morfogenética, não ocorreu a conversão da Put livre à forma conjugada, como relatado para cotilédones de *S. melongena*, cv. Violetta lunga (Scoccianti et al., 2000).

Saliente-se que um decréscimo de Put livre nos cotilédones, antes da visualização da resposta organogênica, também foi observado em cotilédones de *S. melongena* (Scoccianti et al., 2000) e *Cucumis sativus* (Zhu e Chen, 2005), e em hipocótilos de *Brassica oleracea* (Pua et al., 1999). Em nossos experimentos, a redução de Put livre nos cotilédones não se explica totalmente pela conversão a Spd e Spm livres, dado os baixos valores destas PAs nos explantes em cultura, inclusive quando foi adicionada Put exógena ao início do cultivo. Neste caso ocorreu um aumento nos conteúdos endógenos de Put livre e conjugada sem provocar uma mudança nos níveis de Spd e Spm livres. Nossos resultados sugerem que a conversão de Put a Spd e Spm não seja a principal via de utilização de Put livre em cotilédones e hipocótilos de *S. melongena* e, portanto, os baixos conteúdos de Put livre bem como a sua conversão à forma conjugada poderiam estar relacionados à fase indutiva da organogênese. Acrescente-se que o fitorregulador BAP mostrou-se inefetivo ou inibitório na biossíntese de Put, enquanto que

sua combinação com AIA induziram a atividade de biossíntese, sem provocar um acúmulo, em internós de *N. tabacum*, conforme descrito por Scaramagli et al. (1995).

Assim, a variação do conteúdo de Put livre, precursor obrigatório da Spd livre, estaria regulando a razão Put/Spd. Esta relação tem sido considerada crítica para o crescimento e diferenciação organogênica a partir de folhas de várias linhas transgênicas de *N. tabacum* (Kumria e Rajam, 2002), e embriogênica em calos de *Oryza sativa* (Shoeb et al., 2001). Além disto, o aumento de Spm aos sete dias de cultura está de acordo com as observações de Zhu e Chen (2005). Estes autores mostraram que existe um aumento da Spm livre antes da visualização de estruturas vegetativas, sendo altos conteúdos de Spm livre correlacionados com a indução e formação das gemas em cotilédones de *C. sativus*.

Por outro lado, o padrão de variação no conteúdo de Put livre nos explantes de cotilédone e hipocótilo foi semelhante quando mantidos no mesmo tratamento, apresentando teores baixos durante o cultivo, especialmente no tratamento AIA+BAP, assim como os valores de Spd e Spm livres, que em geral, também diminuíram. Destaca-se que, após sete dias, o padrão das PAs totais nas duas regiões dos explantes de cotilédone e hipocótilo foi representado pelo conteúdo das PAs conjugadas, particularmente de Put conjugada. Em geral, os conteúdos de Put conjugada aumentam ao longo da cultura *in vitro* nos dois tipos de explantes, assim como os valores de Spd e Spm conjugadas. Sugere-se que ocorra uma utilização das PAs livres, após a fase de indução, durante o crescimento e diferenciação das estruturas organogênicas, para a síntese das PAs nas formas conjugadas. Uma redução contínua no conteúdo de PAs livres, bem como um aumento geral na forma conjugada das PAs durante o desenvolvimento organogênico, também foi relatado em cotilédones de *S. melongena*, cv. Violetta lunga, durante a organogênese (Scoccianti et al., 2000). Anteriormente, Tiburcio et al. (1988) mostraram que, durante o desenvolvimento de estruturas vegetativas e florais a partir de internós de *N. tabacum*, ocorre uma redução da Put e Spd livres e um aumento na conjugação destas PAs.

Independentemente das condições de cultivo determinantes da organogênese, evidenciou-se que, nos cotilédones, junto a uma evolução morfogenética não definida, ocorriam maiores conteúdos de PAs totais e de PAs conjugadas em relação aos hipocótilos. Ao contrário, os hipocótilos mostraram uma evolução organogenética definida bem como teores de PAs totais, livres e conjugadas, menores que os cotilédones. Além disso, os hipocótilos cultivados nos tratamentos AIA+BAP e controle, que apresentaram uma evolução organogenética semelhante, mostraram conteúdos de Put livre e conjugada, Spd livre e PAs totais também semelhantes. A partir destes resultados, verificou-se a existência de uma correlação positiva entre os conteúdos iniciais de PAs e o tipo de explante, observando-se maiores conteúdos nos cotilédones em comparação aos hipocótilos. Por conseguinte, um maior acréscimo de Put conjugada nos cotilédones, concomitantemente a uma evolução

morfogenética não definida, possivelmente seja consequência dos maiores conteúdos iniciais de Put conjugada em comparação aos hipocótilos. Entretanto, esta relação entre o acúmulo da forma conjugada de PAs, principalmente de Put, e a evolução morfogenética, sugerem um possível envolvimento das PAs conjugadas durante o processo de diferenciação organogenética de *S. melongena*.

Segundo Bouchereau et al. (1999) as PAs conjugadas podem ter a função de proteger as células expostas ao estresse, que em nosso experimento pode ter sido provocado por uma aplicação inadequada na concentração ou combinação de fitorreguladores para os cotilédones, conforme sugerido por Gaspar et al. (2002), resultando numa evolução morfogenética “ineficiente”, concomitantemente a um acúmulo de Put conjugada maior que nos hipocótilos. Por outro lado, Biondi et al. (2001) mostraram que uma inibição da organogênese, devido ao efeito de metil-jasmonato, ocorria paralelamente a um aumento no acúmulo de PAs conjugadas. Coerente com isto, o acúmulo destas PAs geralmente está relacionado à inativação da forma livre, a qual seria a única forma ativa (Bais e Ravishankar, 2002) capaz de participar, direta ou indiretamente, em várias vias metabólicas essenciais aos processos de morfogênese *in vitro* (Gaspar et al., 2003).

Devemos salientar que, independente da evolução morfogenética, o tratamento AIA+BAP+TDZ promoveu um aumento no conteúdo das PAs, nas formas livres e conjugadas, nas fases finais da morfogênese, tanto nos explantes de cotilédone quanto nos de hipocótilo. Porém, este acréscimo foi mais acentuado nos cotilédones, devido aos maiores conteúdos de Put conjugada acumulados nestes explantes. Estes resultados sugerem que o TDZ estimula ou mantém os conteúdos de PAs mais altos. O mecanismo de ação de TDZ está associado, em parte, com a inibição da degradação das citocininas pela citocinina oxidase, resultando num aumento dos conteúdos de citocininas endógenas (Bilyeu et al., 2001; Chatfield e Armstrong, 1987). Várias evidências suportam que as citocininas induzem o acúmulo de PAs (Sergiev et al., 1995; Feray et al., 1992; Rakova e Romanov, 2005), resultando numa possível explicação para as diferenças nos conteúdos de PAs totais observados no tratamento organogênico no qual foi utilizado o TDZ, particularmente nos cotilédones, que mostraram os maiores conteúdos nessas condições de cultivo. É possível que os maiores conteúdos atingidos pelos explantes ao final da cultura estejam relacionados a um estresse provocado por um tratamento com excesso de citocinina. Entretanto, esta hipótese não foi estudada no presente trabalho.

Por outro lado, nossos resultados sugerem ainda que o padrão de variação nos conteúdos de PAs foi uma adaptação às condições que levam à organogênese e ao material usado. Neste sentido, tanto nos explantes de cotilédone como de hipocótilo, entre as PAs na forma conjugada, a Put foi a PA predominante, seguida da Spm e Spd. Em geral, os conteúdos de Put, Spd e Spm conjugadas mostraram uma tendência ao aumento a partir da fase de indução da OG, durante todo o cultivo, nos diversos tratamentos. Assim, para a Spm, os teores

da forma livre ao final da cultura foram menores aos da forma conjugada. Porém, durante o período de cultivo *in vitro*, os teores da Spm livre e conjugada aumentaram em relação aos teores iniciais, independentemente do tratamento. Para a Spd, apesar da diminuição da forma livre ao longo da cultura, o aumento da forma conjugada não foi acentuado como nas outras PAs, e portanto, os valores de Spd livre e conjugada foram muito baixos ao final da cultura. Entretanto, entre as PAs livres, a Spd foi a mais abundante. Adicionalmente, ao comparar-se as PAs nas formas livres e conjugadas, a Put conjugada foi aquela que mostrou os maiores teores, inclusive em relação a Spd livre e Spm conjugada, representando o padrão de variação das PAs totais durante o processo organogênético.

A despeito do possível efeito do meio básico, MB ou MS, suplementado com AIA+BAP, tanto para a resposta organogênica quanto ao conteúdo e padrão de variação de PAs ocorrido em explantes de cotilédone, observou-se diferenças em relação aos conteúdos das diversas PAs apesar da semelhança em relação ao padrão morfogenético obtido. Nos explantes cultivados no meio MS o conteúdo de PAs totais foi maior em relação àqueles em meio MB, devido a um aumento no conteúdo das PAs conjugadas, especialmente quando foram visualizadas as primeiras estruturas morfogenéticas, e a uma tendência de diminuição da Put e Spd livres menos acentuada. Estes resultados, além de corroborar a existência de uma relação entre a conjugação de PAs e a expressão da morfogênese, indicam que a glicina, presente só no meio MS, poderia estar contribuindo tanto na biossíntese de PAs livres como na síntese de ácidos hidrocínâmicos (HCA), aumentando por consequência a conjugação das PAs. Entretanto, até o momento não existem trabalhos que relatam a participação da glicina na síntese de PAs. Por outro lado, apesar da função dos HCA ainda não estar elucidada, seu acúmulo pode ser interpretado como um efeito de um maior conteúdo ou síntese das PAs livres, conforme sugerido por Scocianti et al. (2000).

Durante o processo de ES, a partir de explantes de cotilédone cultivados em meio suplementado com ANA, os maiores conteúdos de PAs livres ocorreram entre os sete e 14 dias de cultura, durante os estágios de indução e formação de calo embriogênico. Altos conteúdos de Put livre foram observados durante a fase indutiva da formação de calo embriogênico em folhas de *S. melongena* (Yadav e Rajam, 1998) e em anteras imaturas de *Vitis vinifera* (Bertoldi et al., 2004), enquanto que altos conteúdos de Spd livre mostraram um papel importante na iniciação de embriões somáticos em *Panax ginseng* (Monteiro et al., 2002). Em relação aos valores iniciais, nesta fase ocorreu um decréscimo de Put livre e um acréscimo de Spd e Spm livres, além de altos teores de Put conjugada, e o início do acúmulo de Spm conjugada. De acordo com os nossos resultados, sugere-se que ocorra uma alta utilização de Put livre para síntese da Spd livre, resultando numa redução da relação Put/Spd inicial entre estas duas PAs livres, e um aumento da Spd e Spm livres, durante a formação do calo embriogênico. Uma variação similar no conteúdo das PAs livres foi observada por Yadav e Rajam (1998) durante o

estágio de aquisição de competência embriogênica, com formação de massas pré-embriogênicas (PEM) em folhas de *S. melongena*, cv. Pusa Purple Long. Apesar de que não foi realizado neste trabalho um estudo anatômico detalhado, aos sete dias de cultivo foram observadas PEM no interior dos explantes de cotilédone de *S. melongena*, cv. F-100, (Tarré et al., 2004). Foi demonstrado que a razão Put/Spd é crítica para o crescimento e diferenciação de embriões somáticos em *Vitis vinifera* e *Oryza sativa* (Faure et al., 1991; Shoeb et al., 2001). Por outro lado, Silveira et al. (2006a) demonstraram que a adição de Spd e Spm ao meio de cultura permitiu a evolução morfogenética, do estágio PEM II ao estágio PEM III, em suspensão embriogênica a partir de sementes imaturas de *Araucaria angustifolia*. A importância da razão entre estas duas PAs também foi observada em nosso trabalho, quando foram aplicadas as PAs exógenas aos tratamentos de indução de ES. Nota-se que somente quando foi adicionada Spd exógena às culturas embriogênicas, não ocorreu uma redução da razão entre a Put e Spd livres, resultando numa diminuição no número de embriões somáticos quando comparado com o tratamento embriogênico suplementado com Put exógena.

Posteriormente, durante a fase de desenvolvimento dos embriões somáticos a partir dos 21 dias, houve uma redução no conteúdo de todas as PAs livres até o final do cultivo, provavelmente devido a sua utilização nesta fase, conforme sugerido para folhas de *S. melongena* por Yadav e Rajam (1998). Esta diminuição nos valores de Put, Spd e Spm livres durante os estágios de desenvolvimento dos embriões somáticos via ES indireta, também foi observada em anteras imaturas de *Vitis vinifera* (Bertoldi et al., 2004). Ao contrário, as formas conjugadas de Put e Spm se mantiveram num patamar semelhante ao observado aos sete dias de cultura, enquanto que os valores de Spd conjugada, ao longo do cultivo, foram inferiores aos das outras PAs conjugadas, e menores aos teores de Spd livre, apesar da redução desta última durante o desenvolvimento dos embriões somáticos. A Put conjugada foi predominante sobre a forma livre, após os sete dias de cultivo, devido à redução contínua nos teores de Put livre ao longo da cultura, e à manutenção de altos teores da forma conjugada desta PA.

Quando comparados os tratamentos ANA e ANA (14d), para a indução da ES, observou-se que o ANA teve um efeito sobre a biossíntese de PAs totais, e que esse efeito é maior quando a presença de ANA é contínua. Este efeito estimulador das auxinas sobre a biossíntese das PAs concorda com que tem sido relatado para outros materiais (Faivre-Rampant et al., 2000; Gaspar et al., 2003). Neste sentido, a manutenção das condições indutivas nas culturas de explantes de cotilédones durante o período em que ocorreu a diferenciação dos embriões somáticos manteve um decréscimo menos acentuado nas PAs livres, especialmente da Spd e Spm livres, associado ao desenvolvimento dos estágios embriogênicos observados mais tardiamente em relação ao tratamento ANA (14d). Assim, sugere-se que, para um melhor desenvolvimento embriogênico, seria favorável a eliminação do estímulo indutivo, já que a suplementação do ANA não foi imprescindível para a expressão

embriogênica a partir de explantes de cotilédones. Por outro lado, estes resultados corroboram a relação entre o desenvolvimento dos embriões e a redução nas PAs livres.

Quando comparados os processos de OG e ES em relação aos conteúdos e padrões de PAs, na forma livre e conjugada, observou-se que, para ambos, o padrão de variação das PAs livres foi semelhante ao longo da cultura *in vitro*. Porém na ES, durante o período inicial de cultivo, a diminuição da Put livre foi menos acentuada, mostrando teores cinco vezes maiores em relação aos valores ocorridos nos explantes mantidos em meio organogênico, e o aumento observado na Spd livre, no processo embriogênico, foi o dobro em relação aos valores ocorridos no processo organogênico. No entanto, os valores de Spm livre, os quais apresentam um acréscimo em relação aos valores originais aos sete dias de cultivo, foram semelhantes para ambos os processos morfogenéticos. Posteriormente, no processo de ES a redução nos teores de PAs livres foi acentuada, alcançando valores semelhantes àqueles observados no processo de OG aos sete dias de cultivo *in vitro*. Aos 28 dias de cultivo, nos dois processos morfogenéticos, os teores de Put, Spd e Spm livres foram muito baixos e próximos entre eles. Foi demonstrado por Cvikrová et al. (1999), em folhas de *Medicago sativa*, que durante o início do cultivo embriogênico ocorrem níveis de PAs livres maiores, bem como um grau de proliferação celular mais intensa, em comparação ao tratamento suplementado com uma combinação de uma auxina e uma citocinina.

Assim, sugere-se que durante o período indutivo ocorram maiores conteúdos iniciais de Put e Spd livres nas condições embriogênicas em relação às organogênicas, devido a uma maior ativação da biossíntese de PAs modulado pelo tratamento hormonal (Scaramagli et al., 1995). A síntese da Put ocorre diretamente através da ornitina pela ornitina descarboxilase, ou indiretamente através de uma série de intermediários, incluindo a agmatina, a partir da arginina via arginina descarboxilase (Kakkar et al., 2000). Yadav e Rajam (1998) demonstraram que os altos níveis de PAs livres, particularmente da Put, deviam-se a uma alta atividade da ADC durante a ES, induzida através do ANA, em folhas de *S. melongena*. Em nosso experimento de ES, os maiores conteúdos de arginina foram observados no início do cultivo, ocorrendo uma diminuição ao longo da cultura (De Souza, 2006). Portanto, o decréscimo no conteúdo de PAs livres durante o cultivo poderia estar correlacionado a uma diminuição na disponibilidade de arginina endógena. Por outro lado, Fobert e Webb (1987) já haviam demonstrado uma correlação negativa entre um incremento na concentração de arginina adicionada em condições embriogênicas, e a resposta embriogenética a partir de cotilédones de *S. melongena*. Scaramagli et al. (1995) também demonstraram que a presença de AIA+BAP em explantes de *N. tabacum* ativa a biossíntese de Put, via ADC, porém um acúmulo desta PA foi relacionado a uma ativação via ODC e ADC. Entretanto, Scoccianti et al. (2000) mostraram que a atividade da ODC era maior em comparação a atividade da ADC durante a organogênese a partir de cotilédones de *S. melongena* tratados com ANA e zeatina.

Em relação às PAs conjugadas, no período em que os explantes ainda não apresentavam um padrão morfogenético determinado, os conteúdos de Put conjugada foram maiores nos explantes mantidos em cultura organogênica, e valores mais elevados foram observados nesta última, até o final do cultivo. Os teores de Spd conjugada, mesmo que baixos para ambos os processos, foram maiores no processo de OG. O resultado mais notável foi em relação aos conteúdos de Spm conjugada, os quais foram significativamente maiores no processo de OG em relação ao de ES, devido a um acréscimo ao longo do cultivo durante a OG; em função disso, este processo mostrou uma relação maior entre a forma conjugada de Spm e a forma livre, que não foi evidente no processo de ES. O padrão de variação das PAs totais no processo de OG foi caracterizado principalmente pela fração conjugada das PAs, Put e Spm. Porém, no processo de ES, aos sete dias de cultivo, foram principalmente as PAs livres que contribuíram para o conteúdo de PAs totais, enquanto que posteriormente só a Put conjugada foi realmente importante.

Em geral, os processos morfogenéticos, tanto de ES como de OG, a partir de explantes de cotilédone, ocorridos em cultivo *in vitro*, foram associados com maiores conteúdos de PAs livres antes da visualização da resposta morfogenética, seguido de uma diminuição de PAs livres durante a expressão, além de aumento e manutenção de altos teores de Put conjugada, a qual passa a ser a PA predominante entre as livres e conjugadas. O acúmulo das PAs conjugadas foi menor no processo de ES.

#### **4.3 Efeito da aplicação de PAs exógenas nas respostas morfogenéticas e no teor endógeno**

Nossos resultados evidenciaram que, dependendo do processo morfogenético e dos fitorreguladores adicionados ao meio de cultivo, podem ser encontrados nos tecidos em cultura, diferentes conteúdos e padrões de PAs. Além disso, a adição de PAs no cultivo embriogênico ou organogênico, resultou em mudanças na morfologia das culturas assim como nos teores endógenos de PAs.

No meio organogênico (OG), a adição de PAs promoveu a incorporação da respectiva PA livre durante a fase indutiva, antes da visualização das primeiras estruturas morfogenéticas, e a conversão a sua forma conjugada durante todo o processo morfogenético. Porém, a aplicação de PAs exógenas teve um efeito contrário na conversão à forma conjugada das outras PAs não adicionadas, durante todo o período de cultivo. Particularmente, a adição de Spm promoveu a manutenção de conteúdos elevados da Spm endógena durante a expressão morfogênica, além de provocar um acréscimo da Put livre durante todo o período de cultura. A partir de nossos resultados, pode-se supor que um aumento na conjugação da respectiva PA adicionada seja consequência de um excesso no conteúdo da sua forma livre, “adaptada” às

condições organogênicas estabelecidas, enquanto que uma redução na conjugação das outras PAs pode-se dever a uma falta de ácidos hidrocínâmicos. Por outro lado, uma inibição da biossíntese de ácidos hidrocínâmicos foi associada a uma redução nos valores de PAs conjugadas, e a um aumento da forma livre (Cvikrová et al., 2003). Dado que em nosso trabalho os conteúdos endógenos de Spd e Spm livres não aumentaram após a adição exógena do seu precursor, é provável que tenha ocorrido uma conversão deficiente devido à falta de grupos aminopropil necessários para biossíntese destas PAs livres. Outra possível explicação seria a limitação de enzimas (S-adenosilmetionina decarboxilase e Spd e Spm sintase) (Bastola e Minocha, 1995). Com relação aos conteúdos endógenos de Spm, nossos resultados sugerem que ocorre a biossíntese de Put livre durante a organogênese, em parte para sua utilização na conversão a Spm. Estes resultados concordam com aqueles de Zhu e Chen (2005), que demonstraram que a adição de Put exógena ao cultivo organogênico de explantes de cotilédones de *C. sativus* provoca um incremento nos conteúdos de Spm endógena.

A adição de PAs ao meio embriogênico (ES), promoveu a incorporação da respectiva PA livre durante a fase indutiva, e manteve seus teores endógenos maiores em relação ao controle durante o resto do período de cultivo. Destaca-se que, ao contrário do processo organogenético, somente a adição de Put e Spm promoveu um acréscimo na conversão da respectiva forma conjugada sem afetar as outras PAs conjugadas, enquanto que a adição de Spd afetou a conjugação da Put livre. Particularmente, a adição de Spm ao meio embriogênico, ao contrário do observado no processo de OG, provocou um decréscimo da Put e Spd livres mais acentuado em relação ao controle.

Nossos resultados estão de acordo com aqueles observados em trabalho com folhas de *S. melongena*, em que a adição de Put exógena afetou somente os conteúdos endógenos de Put livre e conjugada (Yadav e Rajam, 1997, 1998). Entretanto, em nosso trabalho não foi observado um aumento na resposta embriogênica. Estas discrepâncias podem ser atribuídas aos diferentes tipos de explante utilizados, diferentes concentrações de ANA, ou das diferentes condições de crescimento das plântulas nestes dois estudos. Por outro lado, Fobert e Webb (1988) mostraram que a adição de PAs ao meio de cultivo contendo uma concentração de ANA idêntica à utilizada em nosso trabalho, não afetou a resposta de ES em cotilédones de *S. melongena*. Em geral, a adição de PAs exógenas resultou num aumento de tamanho dos explantes devido principalmente a calogênese, sem favorecer a formação de embriões somáticos. Pelo contrário, a presença de Spd provocou uma redução no número de embriões em comparação ao tratamento Put. Resultados semelhantes foram obtidos em explantes de *Panax ginseng*, nos quais as PAs exógenas não promoveram a multiplicação embriogênica, e quando adicionou-se Spd ou Spm, ocorreu uma diminuição da ES, juntamente com um aumento da calogênese (Kevers et al., 2002).



No entanto, a adição de Spd no estágio de iniciação da ES, aumentou a resposta embriogênica (Kevers et al., 2002; Monteiro et al., 2002).

Assim, pode-se concluir que no processo embriogênico, em geral, a maior variação nos conteúdos de PAs foi em relação à fração das PAs livres, e a adição exógena destas afetou principalmente o conteúdo endógeno das mesmas. Ao contrário, no processo organogenético, as maiores mudanças no conteúdo endógeno de PAs ocorreu na fração conjugada, e a aplicação de PAs exógenas apresentou um efeito mais significativo, especialmente para o conteúdo de Put conjugada.

#### **4.4 Considerações finais e perspectivas**

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram a existência de uma relação interdependente dos fitorreguladores e poliaminas na determinação dos processos de ES e OG, que abrem mais perspectivas para o entendimento de seu controle. Por outro lado, deve-se salientar as peculiaridades de indução e expressão das duas vias morfogenéticas aqui estudadas, que confirmam que nosso sistema é um bom modelo para estudos desse tipo.

Assim, a partir das observações feitas em nosso trabalho, surgem algumas novas possibilidades de exploração de caminhos que levem à ampliação do conhecimento do mecanismo do estabelecimento e do controle dos programas morfogenéticos. Acreditamos que esforços devem ser concentrados no estudo do papel das PAs conjugadas, e das possíveis causas e efeitos de seu acúmulo. Por outro lado, a existência de uma relação entre os conteúdos de arginina e de PAs nos hipocótilos e nos cotilédones de *S. melongena*, sugerem que novas investigações devem ser feitas, principalmente com referência aos precursores de PAs. A partir das evidências surgidas da existência de uma correlação dos conteúdos de PAs endógenas com a morfogênese, sugere-se o estudo da atividade das enzimas relacionadas à biossíntese (ODC e ADC) e catabolismo (DAO e PAO) de PAs, principalmente através do efeito de inibidores enzimáticos. Adicionalmente, abordagens utilizando técnicas citológicas e imunocitoquímicas durante a fase indutiva possibilitariam uma melhor descrição dos eventos relacionados com a divisão e crescimento celular, em suma, com a diferenciação que precede a expressão da organogênese.

Finalmente, deve-se lembrar que a interação de diferentes fitorreguladores que conduz à expressão organogenética, é feita numa primeira etapa através da sinalização que leva à expressão gênica, com a conseqüente produção de proteínas características. A identificação de proteínas peculiares associadas às diversas etapas dos processos morfogenéticos, através do estudo dos proteomas, já tem sido feita em estudos de embriogênese (Silveira et al., 2006b), onde proteínas características tem sido associadas a diferentes estágios

embriogénéticos. Este é mais um tipo de estudo que julgamos de interesse, onde o sistema de *S. melongena* que utilizamos pode ser extremamente útil.

## REFERÊNCIAS

- Alicchio R, Del Grosso E, Boschieri E. Tissue cultures and plant regeneration from different explants in six cultivars of *Solanum melongena*. *Experientia*. 1982; 38:449 -450.
- Altamura MM, Torrigiani P, Falasca G, Rossini P, Bagni N. Morpho-functional gradients in superficial and deep tissues along tobacco stem: polyamines levels, biosynthesis and oxidation, and organogenesis *in vitro*. *J Plant Physiol*. 1993; 142:543 -551.
- Amutha S, Muruganantham M, Ganapathi A. Thidiazuron-induced high-frequency axillary and adventitious shoot regeneration in *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *In vitro Cell Dev Biol-Plant*. 2006; 42:26 -30.
- Antognoni F, Fornalè S, Grimmer C, Komor E, Bagni N. Long-distance translocation of polyamines in phloem and xylem of *Ricinus communis* L. plants. *Planta*. 1998; 204:520 -527.
- Aribaud M, Carré M, Martin-Tanguy J. Polyamine metabolism and *in vitro* cell multiplication and differentiation in leaf explants of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *Plant Growth Reg*. 1994; 15: 143 -155.
- Aribaud M, Kevers C, Martin-Tanguy J, Gaspar TH. Low activity of amine-oxidases and accumulation of conjugated polyamines in disfavour of organogenic programs in *Chrysanthemum* leaf disc explants. *Plant Cell Tiss Org Cult*. 1999; 55:85 -94.
- Bais HP, Ravishankar GA. Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. *Plant Cell Tiss Org Cult*. 2002; 69:1 -34.
- Bastola DR, Minocha SC. Increased putrescine biosynthesis through transfer of mouse ornithine decarboxylase cDNA in carrot promotes somatic embryogenesis. *Plant Physiol*. 1995; 109:63 -71.
- Bertoldi D, Tassoni A, Martinelli L, Bagni N. Polyamines and somatic embryogenesis in two *Vitis vinifera* cultivars. *Physiol Plantarum*. 2004; 120:657 -666
- Bilyeu KD, Cole JL, Laskey JG, Riekhof WR, Esparza TJ, Kramer MD, Morris RO. Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from *Zea mays*. *Plant Physiol*. 2001; 125:378 -386.
- Biondi S, Scaramagli S, Capitani F, Altamura MM, Torrigiani P. Methyl jasmonate upregulates biosynthetic gene expression, oxidation and conjugation of polyamines, and inhibits shoot formation in tobacco thin layers. *J Exp Bot*. 2001; 521(355):231 -242.

Biondi S, Scoccianti V, Scaramagli S, Ziosi V, Torrigiani P. Auxin and cytokinin modify methyl jasmonate effects on polyamine metabolism and ethylene biosynthesis in tobacco leaf discs. *Plant Sci.* 2003; 165:95 -101.

Boget N, Torne JM, Willdino L, Santos M. Variation in endogenous polyamine content of maize calli obtained from zygotic and androgenetic embryos. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 1995; 40:139 -144.

Bohmer P, Meyer B, Jacobsen H-J. Thidiazuron-induced high frequency of shoot induction and plant regeneration in protoplast derived pea callus. *Plant Cell Rep.* 1995; 15: 26 -29.

Bouchereau A, Aziz A, Larher F, Martin-Tanguy J. Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci.* 1999; 140:103 -125.

Chatfield JM, Armstrong DJ. Regulation of cytokinin oxidase activity in callus tissues of *Phaseolus vulgaris* L., cv. Great Northern. *Plant Physiol.* 1986; 80:493 -499.

Collonnier C, Fock I, Kashyap V, Rotino GL, Daunay MC, Lian Y, Mariska IK, *et al.* Applications of biotechnology in eggplant. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 2001; 65: 91 -107.

Cvikrová M, Binarová P, Cenklová V, Eder J, Machácková I. Reinitiation of cell division and polyamine and aromatic monoamine levels in alfalfa explants during the induction of somatic embryogenesis. *Physiol Plantarum.* 1999; 105:330 -337.

Cvikrová M, Malá J, Hrubcová M, Eder J, Zon J, Machácková I. Effect of inhibition of biosynthesis of phenylpropanoids on sessile oak somatic embryogenesis. *Plant Physiol Biochem.* 2003; 41:251 -259.

De Jong AJ, Schimidt EDL, De Vries SC. Early events in higher-plant embryogenesis. *Plant Mol Biol.* 1993; 22:367 -377.

Faivre-Rampant O, Kevers C, Dommès J, Gaspar TH. The recalcitrance to rooting of the micropropagated shoots of the *rac* tobacco mutant: implications of polyamines and of the polyamine metabolism. *Plant Physiol Biochem.* 2000; 38(6):441 -448.

FAO. FAOSTAT. Available from: <http://apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture> [2005 Set 18].

Faure O, Mengoli M, Nougarede A, Bagni N. Polyamine pattern and biosynthesis in zygotic and somatic embryo stages of *Vitis vinifera*. *J Plant Physiol.* 1991; 138:545 -549.

Feray A, Hourmant A, Penot M, Moisan-Cann C, Caroff J. Effects of interaction between polyamines and benzyladenine on betacyanin synthesis in *Amaranthus* seedlings. *J Plant Physiol.* 1992; 139:680 -684.

Fiola JA, Hassan MA, Swartz HJ, Bors RH, McNicols R. Effect of thidiazuron, light fluence rate and kanamycin on *in vitro* shoot organogenesis from excised *Rubus* cotyledons and leaves. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 1990; 20:223 -228.

Fobert PR, Webb DT. Effects of polyamines, polyamine precursors and polyamine biosynthetic inhibitors on somatic embryogenesis from eggplant (*Solanum melongena*) cotyledons. *Can J Bot.* 1988; 66:1734 -1742.

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res.* 1968; 50:151 -158.

Gaspar TH, Franck T, Bisbis B, Kevers C, Jouve L, Hausman JF, Dommes J. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Reg.* 2002; 37:263 -285.

Gaspar TH, Kevers C, Faivre-Rampant O, Crèvecoeur M, Penel CL, Greppin H, Dommes J. Changing concepts in plant hormone action. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant.* 2003; 39:85 -106.

Gleddie S, Keller W, Setterfield G. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants and cell suspension of *Solanum melongena* (eggplant). *Can J Bot.* 1983; 61:656 -666.

Guerra MP, Torres AC, Teixeira JB. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JA. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.* v2. Brasília: Embrapa;1999. p.533-568.

Handro W, Floh EIS. Aspectos Básicos do Controle da Morfogênese *in vitro*. In: Torres AC, Caldas L. *Técnicas e Aplicações da cultura de tecidos de plantas.* Brasília: Embrapa; 1990. p. 203-112.

Högberg KA, Ekberg I, Norell L, Von Arnold S. Integration of somatic embryogenesis in a tree breeding programe: a case study with *Picea abies*. *Can J For Res.* 1998; 28:1536 -1545.

Jiménez VM. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. *Rev Bras Fisiol Veg.* 2001; 13(2):196 -223.

Kakkar RK, Nagar PK, Ahuja PS, Rai VK. Polyamines and plant morphogenesis. *Biol Plantarum.* 2000; 43:1 -11.

Kakkar RK, Sawhney VK. Polyamine research in plants - a changing perspective. *Physiol Plantarum.* 2002; 116:281 -292.

Kaloo G. Eggplant (*Solanum melongena* L.). In: *Genetic Improvement of vegetable Crops.* Oxford: Pergamon Press; 1993. p. 587-604.

Kantharajah AS, Golegaonkar PG. Somatic embryogenesis in eggplant. *Scientia Horticulturae*. 2004; 99:107 -117.

Kashyap V, Kumar SV, Collonnier C, Fusari F, Haicour R, Rotino GL, Sihachakr D, Rajam MV. Biotechnology of eggplant. *Scientia Horticulturae*. 2003; 97:1-25.

Kevers C, Gaspar TH, Dommes J. The beneficial role of different auxins and polyamines at successive stages of somatic embryo formation and development of *Panax ginseng in vitro*. *Plant Cell Tiss Org Cult*. 2002; 70:181 -188.

Kumria R, Rajam MV. Ornithine decarboxylase transgene in tobacco affects polyamines, *in vitro*-morphogenesis and response to salt stress. *J Plant Physiol*. 2002; 159:983 -990.

Legocka J, Zarnowska A. Role of polyamines in the cytokinin-dependent physiological processes. I. Effect of benzyladenine on polyamine levels during chloroplast differentiation in the tissue culture of *Dianthus caryophyllus*. *Acta Physiol Plantarum*. 1999; 21(4): 349 -354.

Lo Schiavo F, Pitto L, Giuliano G, Torti G, Nuti Ronchi V, Marazziti D, Vergara R, Oselli S, Terzi M. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theor and Applied Gen*. 1990; 77:325 -331.

Magioli C, Mansur E. Eggplant (*Solanum melongena* L.): tissue culture, genetic transformation and use as an alternative model plant. *Acta Bot Bras*. 2005; 19(1):139 -148.

Magioli C, Rocha APM, de Oliveira DE. Efficient shoot organogenesis of eggplant (*Solanum melongena* L.) induced by thidiazuron. *Plant Cell Rep*. 1998; 17:661 -663.

Martin-Tanguy J. Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). *Plant Growth Reg*. 2001; 34:135 -148.

Matsuoka H, Hinata K. NAA-induced organogenesis and embryogenesis in hypocotyl callus of *Solanum melongena* L. *J Exp Bot*. 1979; 30(116):363 -370.

Minocha SC, Minocha R. Role of polyamines in somatic embryogenesis. In: Bajaj YPS. *Biotechnology in agriculture and forestry: Somatic embryogenesis and synthetic seeds*. Berlin: Springer-Verlag; 1995. vol. 30, p.53-70.

Monteiro M, Kevers C, Dommes J, Gaspar TH. A specific role for spermidine in the initiation phase of somatic embryogenesis in *Panax ginseng* CA Meyer. *Plant Cell Tiss Org Cult*. 2002; 68:225 -232.

Mukherjee SK, Rathinasabapathi B, Gupta N. Low sugar and osmotic requirements for shoot regeneration from leaf pieces of *Solanum melongena* L. *Plant Cell Tiss Org Cult*. 1991; 25:13 -16.

Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plantarum*. 1962; 15:473 -497.

Murthy BNS, Murch SJ, Saxena PK. Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In vitro Cell Dev Biol-Plant*. 1998; 34:267 -275.

Nordström A, Tarkowski P, Tarkowski D, Norbaek R, Astot C, Dolezal K, Sandberg G. Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. *PNAS*. 2004; 101(21):8039 -8044.

Paschalidis KA, Roubelakis-Angelakis KA. Spatial and temporal distribution of polyamine levels and polyamine anabolism in different organs/tissues of the tobacco plant: correlations with age, cell division/expansion, and differentiation. *Plant Physiol*. 2005; 138:142 -152.

Papadakis A, Paschalidis KA, Roubelakis-Angelakis KA. Biosynthesis profile and endogenous titers of polyamines differ in totipotent and recalcitrant plant protoplasts. *Physiol Plant*. 2005; 125:10 -20.

Pedroso MC, Primikiris N, Roubelakis-Angelakis KA, Pais MS. Free and conjugated polyamines in embryogenic and non-embryogenic leaf regions of camellia leaves before and during direct somatic embryogenesis. *Physiol Plant*. 1997; 101:213 -219.

Picoli EAT, Otoni Campos W. Morfogênese em beringela influenciada por higromicina e períodos de exposição em ANA. *Ciênc Agrotec*. 2001; 25(6): 1474 -1481.

Pua E-C, Deng X, Koh AT-C. Genotypic variability of *de novo* shoot morphogenesis of *Brassica oleracea in vitro* in response to ethylene inhibitors and putrescine. *J Plant Physiol*. 1999; 155:598 -605.

Rakova NY, Romanov GA. Polyamines suppress manifestation of cytokinin primary effects. *Russ J Plant Physiol*. 2005; 52(1):59 -67.

Sahrawat AK, Chand S. High-frequency plant regeneration from coleoptile tissue of indica rice (*Oryza sativa* L.). *In vitro Cell Dev Biol-Plant*. 2001; 37:55 -61.

Scaramagli S, Bueno M, Torrigiani P, Altamura MM, Capitani F, Bagni N. Morphogenesis in cultured thin layers and pith explants of tobacco: II. Early hormone-modulated polyamine biosynthesis. *J Plant Physiol*. 1995; 147:113 -117.

Scoccianti V, Sgarbi E, Fraternali D, Biondi S. Organogenesis from *Solanum melongena* L. (eggplant) cotyledon explants is associated with hormone-modulated enhancement of polyamine biosynthesis. *Protoplasma*. 2000; 211:51 -63.

Sergiev IG, Alexieva VS, Karanov EM. Cytokinin and anticytokinin effects on growth and free polyamine content in etiolated and green radish cotyledons. *J Plant Physiol*. 1995; 145:266 -270.

Sharma P, Rajam MV. Genotype, explant and position effects on organogenesis and somatic embryogenesis in eggplant (*Solanum melongena* L). J Exp Bot. 1995a; 46(282):135-145.

Sharma P, Rajam MV. Spatial and temporal changes in endogenous polyamine levels associated with somatic embryogenesis from different hypocotyls segments of eggplant (*Solanum melongena* L). J Plant Physiol. 1995b; 146:658 -664.

Sharma P, Yadav JS, Rajam MV. Induction of laterals in root cultures of eggplant (*Solanum melongena* L.) in hormone-free liquid medium: a novel system to study the role of polyamines. Plant Sci. 1997; 125:103 -111.

Sharp WR, Sohndahl MR, Evans AE, Caldas LA, Maraffa SB. The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. Horticult Rev. 1980; 2:268 -310.

Shoeb F, Yadav JS, Bajaj S, Rajam MV. Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism in different genotypes of indica rice. Plant Sci. 2001; 160:1229 -1235.

Silveira V, Floh EIS, Handro W, Guerra MP. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. Plant Cell Tiss Org Cult. 2004; 76:53 -60.

Silveira V, Santa-Catarina C, Tun NN, Scherer GFE, Handro W, Guerra MP, Floh EIS. Polyamine effects on the endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucária angustifolia* (Bert.) O. Ktze. Plant Sci. 2006a; 171(1):91 -98.

Silveira V, Santa-Catarina C, Balbuena TS, Moraes FMS, Ricart CAO, Sousa MV, Guerra MP, Handro W, Floh EIS. Endogenous abscisic acid and protein contents during seed development of *Araucaria angustifolia*. Biol Plantarum. 2006b; (in press).

Skoog F, Miller CO. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symp Soc Exp Biol. 1957; 11:118 -131.

Sokal RR, Rohlf FJ. Biometry. 3. ed. New York: Freeman and Co; 1995. 957 p.

Souza CC. Aspectos bioquímicos da morfogênese em berinjela (*Solanum melongena* L. cv. Embú) [qualificação (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo (Brasil). Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2006.

Tarré E, Magioli C, Margis-Pinheiro M, Sachetto-Martins G, Mansur E, Santiago-Fernandes LDR. Rev Bras Bot. 2004; 27(1):79 -84.

Tiburcio AF, Kaur-Sawhney R, Galston AW. Polyamine biosynthesis during vegetative and floral bud differentiation in thin layer tobacco tissue cultures. Plant Cell Physiol. 1988; 29(7):1241 -1249.



Von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J, Filonova L. Development pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 2002; 69:233 -249.

Walden R, Cordeiro A, Tiburcio AF. Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development. *Plant Physiol.* 1997; 113:1009 -1013.

Yadav JS, Rajam MV. Spatial distribution of free and conjugated polyamines in leaves of *Solanum melongena* L. associated with differential morphogenetic capacity: efficient somatic embryogenesis with putrescine. *J Exp Bot.* 1997; 48(313):1537 -1545.

Yadav JS, Rajam MV. Temporal regulation of somatic embryogenesis by adjusting cellular polyamine content in eggplant. *Plant Physiol.* 1998; 116:617 -625.

Zhu C, Chen Z. Role of polyamines in adventitious shoot morphogenesis from cotyledons of cucumber *in vitro*. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 2005; 81:45 -53.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)