



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**EMMANUEL DE SOUSA JEREISSATI**

**INDUÇÃO, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS  
DE CALOS DE FEIJÃO-DE-CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) Walp].**

**FORTALEZA-CE**

**2008**

**EMMANUEL DE SOUSA JEREISSATI**

**INDUÇÃO, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS  
DE CALOS DE FEIJÃO-DE-CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) Walp].**

Dissertação Submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr.: Francisco de Assis de Paiva Campos

**FORTALEZA-CE**

**2008**

**EMMANUEL DE SOUSA JEREISSATI**

**INDUÇÃO, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS  
DE CALOS DE FEIJÃO-DE-CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) Walp].**

Dissertação Submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica. A transcrição de qualquer trecho desta Dissertação é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

Dissertação Aprovada em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / 2008

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Francisco de Assis de Paiva Campos (Orientador)**  
Universidade Federal do Ceará-UFC

---

**Prof. Dra. Arlete Aparecida Soares (Conselheiro)**  
Universidade Federal do Ceará-UFC

---

**Prof. Dr. Márcio José da Silva (Conselheiro)**  
Universidade Estadual de Campinas-Unicamp

## RESUMO

Embriogênese Somática é o processo pelo qual, tecidos somáticos vegetais dão origem a embriões de plantas sob condições indutivas. A embriogênese somática é atualmente a ferramenta mais empregada para a propagação de plantas em escala comercial. Recentemente foram identificados alguns genes envolvidos no processo. Alguns desses genes estão envolvidos com a manutenção do meristema, outros estão envolvidos com a formação de padrão. Existem genes que quando expressos ectopicamente podem induzir a formação de embriões somáticos. Existem poucos trabalhos na literatura sobre a embriogênese somática em feijão-de-corda. Além disso, esses trabalhos apresentam uma frequência de regeneração pequena e um complicado sistema de regeneração que envolve muitas etapas. O objetivo deste trabalho foi isolar linhagens de calos embriogênicos de feijão-de-corda e estabelecer as condições de cultivo ideais para estes calos. Análises histológicas foram utilizadas para a caracterização anatômica das linhagens de calos isolados. Das 4 linhagens de calos isolados três apresentam células com características de células embriogênicas, sendo que apenas a linhagem 2 deu origem a estruturas embriogênicas em suspensão celular. Essas linhagens de calos foram subcultivadas por mais de um ano sem perder as suas características. Os experimentos de crescimento das suspensões celulares mostraram que as suspensões devem ser subcultivadas em períodos de 5 dias. Os próximos trabalhos que envolvam a regeneração em feijão-de-corda devem trabalhar com essa linhagem de calo facilmente isolável e altamente estável em cultura.

Palavras-chave: Linhagens de Calos, Embriogênese Somática, Feijão-de-corda.

## ABSTRACT

Somatic embryogenesis is the process by which somatic plant tissues gives rise to plant embryos under inductors conditions. Somatic embryogenesis represents the most commonly employed tool in commercial propagation of plants. In recent times, genes involved in the process have been identified, particularly those involved in the maintenance of meristems and pattern formation. There are genes which, when ectopically expressed, can induce the formation of somatic embryos. In cowpea, there are few reports on somatic embryogenesis. In addition, the reports on the process recorded a very low frequency and a complicated system of regeneration involving several steps. This work attempted to isolate callus lines of cowpea and establish an ideal culture condition necessary for their maintenance. Histological analysis was conducted to characterize the isolated lines of callus anatomically. From the four lines obtained, 3 presented cells exhibiting the characteristic embryogenic potential and of this, Line 2 actually gave rise to embryogenic structures when cultured in liquid media. The lines of callus were maintained in cultured condition for over a year without loss of their characteristics. Experiments that monitored the growth of cell suspension from the callus revealed that five days is the best period for subculture of the cells. Regeneration experiments in cowpea will find the different callus lines isolated in this work useful in the attempt to optimize the different strategies of regeneration of the crop *in vitro*.

Key-Words: Callus Lines, Somatic Embryogenesis, Cowpea.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>	<b>PÁGINA</b>
FIGURA 1 - Indução de calos utilizando 2,4-D, Picloram e 2,4,5-T.....	60
FIGURA 2 - Linhagens de calos isolados a partir de calos primários.....	65
FIGURA 3 - Análise histológica da linhagem de calos 1.....	69
FIGURA 4 - Análise histológica da linhagem de calos 2.....	70
FIGURA 5 - Análise histológica da linhagem de calos 3.....	71
FIGURA 6 - Análise histológica da linhagem de calos 4.....	72
FIGURA 7 - Curva de crescimento da suspensão celular embriogênica.....	75
FIGURA 8 - Curva de incremento de massa fresca da suspensão celular embriogênica (inoculo 0,1 mL).....	76
FIGURA 9 - Curva de incremento de massa fresca da suspensão celular embriogênica (inóculo 1,0 mL).....	77
FIGURA 10 - Aspecto dos calos da linhagem 2 cultivados nos meios de histodiferenciação.....	80

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA</b>	<b>PÁGINA</b>
TABELA 1 - Composição dos meios de indução de calos utilizados neste trabalho.....	55
TABELA 2 - Composição dos meios de histodiferenciação e suspensão celular utilizados neste trabalho.....	56
TABELA 3 - Reagentes utilizados e sua procedência.....	57
TABELA 4 - Explantes utilizados nos experimentos de indução de calos.....	63
TABELA 5 - Características das linhagens de calos de feijão-de-corda.....	66
TABELA 6 - Resposta dos explantes foliares ao pulso de auxina sintética 2,4-d.....	81

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA - Ácido abscísico  
 ABRE - ABA Response Elements  
*ABI3* - *ABA-INSENSITIVE3*  
 AFLPs - Amplified Fragment Length Polymorphisms  
 AGPs - Proteínas Arabinogalactano  
 AIA - Ácido indol 3-acético  
*At* - *Arabidopsis thaliana*  
 BAP - 6-Benzilaminopurina  
 B5 - Meio de cultura descrito por Gamborg (1963)  
 Ca<sup>2+</sup> - Íon Cálcio  
 CaM - Calmodulina  
 cDNA - DNA complementar  
 CDPKs - proteínas quinases cálcio dependente/calmodulina independente  
 Cin - Cinetina  
*CLV* - *CLAVATA*  
 cv. - Cultivar  
 cm - Centímetro  
 °C - Graus Celsius  
*Dc* - *Daucus carota*  
 2,4-D - Ácido 2,4 - diclorofenoxiacético  
 DAA - Dias após a antese  
 DNA - Ácido Desoxirribonucléico  
 DAF - DNA Amplification Fingerprinting  
 ECM - Extracelular Matrix  
 ECP - Extracellular Protein  
 ESD - Embriogênese Somática Direta  
 ESI - Embriogênese Somática Indireta  
 EUA - Estados Unidos da América  
*FUS3* - *FUSCA3*  
 GA - Ácido giberélico  
 GC 1,5 - Meio de Indução de Calos Primários  
*HBT* - *HOBBIT*  
 HD-Zip - Homeodomínio Zíper de leucina  
 HSP - Heat Shock Protein  
 HTH - Helix-Turn-Helix  
 KN1 - *KNOTTED1*  
 LCOs - Lipoquitoligossacarídeos  
 LEA - Late Embryogenesis Abundant Proteins  
*LEC1* - *LEAFY COTYLEDON1*  
 LRRs - Leucin-Rich Repeats  
 MAPK - Mitogen-activated protein kinase  
 MPEs - Massas Pró-Embriogênicas  
 mg - Miligrama  
 mg/L - Miligramas por Litro  
 mL - Mililitro

MP-PCR - Microsatellite Primed-PCR  
mRNA - RNA mensageiro  
MS - Meio de cultura descrito por Murashige & Skoog (1962)  
n - haplóide  
2n - diplóide  
3n - triplóide  
PCR - Polimerase Chain Reaction  
PCV - Packed Cell Volume  
pH - Potencial de Hidrogênio Iônico  
*PKL - PICKLE*  
PR-Proteínas - Proteínas Relacionadas à Patogênese (PR)  
% - Percentagem  
RNA - Ácido Ribonucléico  
RAPDs - Random Amplified Polymorphic DNAs  
RFLPs - Restriction Fragment Length Polymorphisms  
RU - Reino Unido  
SAUR - Small Auxin Up-Regulated  
SERK - Somatic Embryogenesis Receptor Kinase  
SC - Suspensão Celular  
*STM - SHOOTMERISTEMLESS*  
SSRs - Simple Sequence Repeats  
STMS - Sequence Tagged Microsatellite Sites  
STS - Sequence Tagged Sites  
2,4,5-T - Ácido 2,4,5 - Triclorofenoxiacético  
TDZ - Thidiazuron  
tRNA - RNA transportador  
*WUS - WUSCHEL*  
µm - Micrometro

## SUMÁRIO

<b>Conteúdo</b>	<b>Página</b>
RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	6
LISTA DE TABELAS.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. A morfologia celular e a sua relação com a competência embriogênica.....	15
1.2. Embriogênese somática.....	16
1.3. Embriogênese somática em plantas leguminosas.....	20
1.4. Embriogênese somática em feijão-de-corda.....	21
1.5. Indução de embriogênese somática.....	24
1.5.1. O Estresse.....	24
1.5.2. Reguladores de crescimento e fito-hormônios.....	25
1.5.3. Moléculas secretadas.....	28
1.5.3.1. Proteínas extracelulares.....	28
1.5.3.2. Proteínas arabinogalactano (AGPs).....	29
1.5.3.3. Lipoquitooligossacarídeos (LCOs).....	29
1.6. ASPECTOS MOLECULARES DA EMBRIOGÊNESE.....	30
1.6.1. Expressão gênica durante a embriogênese zigótica.....	30
1.6.2. Embriões zigóticos mutantes e a elucidação dos mecanismos da embriogênese.....	31
1.6.3. Marcadores moleculares.....	36
1.6.4. Expressão gênica relacionada com a embriogênese somática.....	37
1.6.4.1. Genes de manutenção (Housekeeping).....	38
1.6.4.2. Genes induzidos por auxina.....	39
1.6.4.3. Genes induzidos por ABA.....	40

1.6.4.4. Vias de transdução de sinais associadas ao desenvolvimento do embrião.....	41
1.6.4.4.1. Transdução de sinal mediada por cálcio.....	41
1.6.4.4.2. SERK (Somatic embryogenesis receptor kinase).....	42
1.6.4.5. Genes homeóticos.....	43
1.6.5. Considerações finais.....	44
2. OBJETIVOS.....	47
2.1. Objetivo geral.....	48
2.2. Objetivos específicos.....	48
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
3.1. Material vegetal.....	50
3.2. Assepsia dos explantes.....	50
3.3. Meios de cultura utilizados.....	50
3.4. Preparo dos meios de cultura.....	51
3.5. Reagentes utilizados.....	51
3.6. Indução de formação de calos a partir de explantes foliares, utilizando diferentes fito- reguladores sintéticos (2,4-D, Picloram e 2,4,5-T).....	51
3.7. Indução de calos utilizando diferentes explantes.....	51
3.8. Estabelecimento e manutenção das linhagens de calos embriogênicos.....	52
3.9. Análise histológica.....	52
3.10. Experimentos de histodiferenciação.....	53
3.11. Efeito do pulso de 2,4-D sob a indução de calos embriogênicos no feijão-de-corda.....	53
3.12. Estabelecimento e manutenção das suspensões celulares.....	53
3.13. Curva de crescimento das células embriogênicas em suspensão celular.....	54
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
4.1. Indução de formação de calos a partir de explantes foliares, utilizando diferentes fito- reguladores sintéticos (2,4-D, Picloram e 2,4,5-T).....	59
4.2. Indução de calos embriogênicos utilizando diferentes tipos de explantes.....	61
4.3. Formação dos calos primários, isolamento e caracterização das linhagens de calos embriogênicos.....	62
4.4. Análise histológica das diferentes linhagens de calos embriogênicos.....	67
4.5. Estabelecimento e manutenção das suspensões celulares.....	73

4.6. Curva de crescimento das células embriogênicas em suspensão celular.....	74
4.7. Experimentos de histodiferenciação.....	78
4.7.1 Efeito do pulso de 2,4-D sobre a histodiferenciação de calos em feijão-de-corda.....	78
5. CONCLUSÕES.....	82
6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS.....	86

## **1. INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

O feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é uma leguminosa comestível dotada de alto conteúdo protéico, boa capacidade de fixar nitrogênio e pouco exigente em fertilidade do solo (ARAÚJO, 1988). A cultura desta leguminosa ocorre principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do globo. A maior parte da produção mundial (92%) ocorre na África onde são consumidas quase todas as partes da planta incluindo as folhas e o caule (POPELKA et al., 2004). No Brasil é produzido predominantemente na região Nordeste, sendo as suas sementes utilizadas como base da dieta do povo desta região.

O feijão-de-corda é uma fonte boa e barata de proteínas, vitaminas, minerais e fibras para a população dos países em desenvolvimento onde a proteína de origem animal é cara ou escassa (ONYENEKWE et al., 2000) e por esses motivos é um importante alimento para o povo nordestino, tendo um papel socioeconômico significativo para a região.

Embora apresente boas características nutricionais e de adaptabilidade às condições climáticas do semi-árido, a produção do feijão-de-corda tem sido limitada devido a doenças e pragas que afetam essa cultura. A baixa produtividade também está relacionada às adversidades climáticas e às limitações do pequeno produtor (CARDOSO, 2000; POPELKA et al., 2004).

Níveis de aceitáveis de resistência a algumas das pragas que atacam essa cultura foram encontrados na espécie não domesticada *Vigna vexillata* e em outras espécies selvagens. Conseqüentemente uma estratégia para aumentar a resistência a insetos no feijão-de-corda é acessar os genes de resistência nas espécies selvagens de *Vigna*. A introdução de genes que confirmam resistência a insetos no feijão-de-corda tem o potencial para resolver o problema e pode ter um impacto positivo sobre a seguridade alimentar especialmente nas regiões mais pobres do mundo (PELLEGRINESCHI et al., 1997).

Pelo elevado valor socioeconômico que o feijão-de-corda representa para a região Nordeste e mais especificamente para o Estado do Ceará, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos que produzam protocolos de regeneração para essa planta tornando-a apta a receber as tecnologias de transferência de genes que podem melhorar e elevar a produtividade desta cultura.

Dentro deste contexto o estabelecimento de culturas de calos e a seleção de tipos apropriados para a indução de embriogênese somática nessa espécie é um trabalho relevante que possibilitará o desenvolvimento de um sistema de regeneração eficiente em um futuro próximo.

### **1.1. A morfologia celular e a sua relação com a competência embriogênica**

Embora totipotência seja uma característica importante das células vegetais, sob condições específicas nem todas as células têm a capacidade de expressá-la. Mesmo quando isolamos tipos de calos embriogênicos muito uniformes no qual todas as células podem ser consideradas igualmente totipotentes, o número de embriões formados é menor do que o número de células no agregado celular.

A habilidade de um tecido ou agregado celular de formar embriões somáticos é uma característica de uma fração limitada da população celular. Alguns autores (HALPERIN et al., 1966; NOMURA E KOMAMINE, 1985) trabalhando com cenoura verificaram que a morfologia celular é um fator importante para a competência embriogênica. Células pequenas e arredondadas apresentavam a capacidade de formar embriões enquanto que as alongadas não apresentavam. Por outro lado, Toonen et al., 1994 utilizando o mesmo modelo biológico, fizeram uma distinção entre cinco tipos celulares morfologicamente distintos que apresentavam capacidade de formar embriões somáticos em cultura. Apesar dos tipos celulares serem na sua maioria de células pequenas e arredondadas, as células alongadas também apresentavam a capacidade de formar embriões sugerindo que tal habilidade não é um processo restrito a um tipo celular morfologicamente distinto.

O tipo de calo também é um fator importante a ser considerado. Calos embriogênicos de cenoura apresentam características nodulares e uma superfície lisa enquanto que os calos não embriogênicos são rugosos, friáveis e translúcidos (JIMENEZ & BANGERTH, 2001a). A coloração também pode ser usada como um critério de seleção entre calos embriogênicos e não-embriogênicos. Calos embriogênicos de café são marrons (presença de compostos fenólicos) e duros, enquanto que os não embriogênicos são pálidos e friáveis (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2002b). A correlação entre a aparência dos calos e a competência embriogênica foi confirmada por estudos histológicos (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2002a; JIMENEZ AND BANGERTH, 2001b).

Na maioria dos sistemas descritos até agora, as células embriogênicas apresentam características comuns às células meristemáticas; alta frequência de divisão celular, células que são isodiamétricas, pequenas, de citoplasma denso, presença de amido, núcleo grande com um nucléolo proeminente, vários vacúolos pequenos, parede celular espessa (WILLIAMS & MAHESWARAN, 1986) e uma alta atividade metabólica que pode ser avaliada pelo uso de corantes específicos para proteínas como o azul brilhante de coomassie.

O uso de marcadores específicos para fazer distinção entre células embriogênicas e não embriogênicas tem sido usado em alguns sistemas experimentais. Deposição de calose na parede celular e a presença de  $\text{Ca}^{++}$  vacuolar em *Cichorium* (VERDUS et al., 1993) são os primeiros sinais de competência embriogênica nessa planta. O uso de anticorpos monoclonais contra diferentes componentes da parede celular vegetal bem como contra proteínas secretadas no meio de cultura são marcadores moleculares úteis para diferenciar entre células embriogênicas e não embriogênicas (TCHORBADJIEVA et al., 2005).

A morte celular programada está envolvida em vários processos morfogenéticos (GREENBERG, 1996; PENNEL & LAMB, 1997), incluindo a embriogênese somática, na qual faz parte na degradação das células do suspensor ou auxiliando a formação de padrão dos tecidos embrionários originados das massas pró-embriogênicas (FILONOVA et al., 2000). Schmidt et al., 1997 identificaram vários genes de células em suspensão celular de cenoura. Um desses genes chamado Somatic Embryogenesis Receptor Kinase (SERK) é um marcador de células competentes para formar embriões. As células identificadas são alongadas e vacuoladas e a expressão de SERK foi detectada até o estágio globular. Por outro lado, as células de *Dactylis glomerata* (SOMLEVA et al., 2000) expressando SERK são pequenas, isodiamétricas e apresentam um citoplasma denso o que sugere mais uma vez a falta de correlação entre a forma celular e a competência embriogênica. Em 2001, um gene homólogo de SERK foi clonado em *Arabidopsis thaliana* (*AtSERK1*). A expressão deste gene está restrita às células embriogênicas como também aos embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento. Células cultivadas provenientes de plantas transgênicas expressando ectopicamente *AtSERK1* apresentaram uma alta eficiência embriogênica (HECHT et al., 2001).

O sucesso em estabelecer uma linhagem celular competente para regenerar em plantas em diferentes espécies depende da habilidade de reconhecer o tipo celular apropriado. Apesar de em muitos casos ser possível distinguir entre calos embriogênicos e não embriogênicos baseando-se apenas nas características físicas, isso por si só não provem informação completa sobre qual tipo celular é apropriado para o processo de embriogênese somática.

## **1.2. Embriogênese Somática**

Um dos exemplos mais notáveis de flexibilidade de desenvolvimento em plantas é a capacidade de diferentes tipos celulares em adição ao zigoto de iniciar o desenvolvimento embrionário. Estes tipos celulares podem ser reprogramados in vivo, através de vias

coletivamente chamadas de apomixia ou através de pelo menos três formas *in vitro*: fertilização *in vitro*, microsporia e embriogênese somática *in vitro*. Segundo Quiroz-Figueroa et al., 2006, a embriogênese somática pode ser definida como o processo pelo qual células somáticas, sob condições indutivas, dão origem a células embriogênicas, as quais sofrem uma série de mudanças morfológicas e bioquímicas que resultam na formação de embriões somáticos. Esse processo pode ser reconhecido como a expressão da totipotência celular e é um fenômeno exclusivo das plantas superiores.

A embriogênese somática é uma das duas vias pelas quais as células em cultura podem ser regeneradas em plantas na ausência de um meristema tipicamente ativo. Os embriões somáticos não apresentam conexões vasculares com o tecido materno, mas possuem meristemas apicais e radiculares podendo, portanto germinar. A segunda via é conhecida como organogênese e é caracterizada pela formação de meristemas radiculares ou apicais. As partes aéreas obtidas pelo alongamento dos meristemas apicais podem ser enraizadas e plantas completas são assim obtidas.

A primeira observação deste fenômeno *in vitro* aconteceu em 1957 em culturas de *Oenanthe aquatica*, trabalho realizado por Harry Waris (KRIKORIAN & SIMOLA, 1999) seguido pelos conhecidos trabalhos realizados independentemente por F. C. Steward and Jakob Reinert em cenoura (STEWART et al., 1958, REINERT, 1958). Esses relatos marcaram o início de uma nova era na biologia vegetal abrindo espaço para um novo campo de pesquisa.

Nos 20 anos seguintes, pouco progresso foi feito na compreensão dos mecanismos que governam a embriogênese somática, principalmente por que esse processo ocorre *in vitro* apenas em baixa frequência e de maneira assíncrona. De fato este é um problema pertinente da grande maioria dos sistemas desenvolvidos até os dias de hoje.

Os embriões somáticos obtidos *in vitro*, ao contrário dos embriões zigóticos, não estão encerrados nos tecidos maternos e podem ser propagados em grande quantidade. Por esses motivos, a embriogênese somática além de ser útil para clonagem e propagação vegetativa de plantas (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2006) também pode servir como modelo de estudo dos eventos moleculares, citológicos e fisiológicos que controlam a embriogênese em plantas (DODEMAN et al., 1997).

Embora os embriões somáticos assemelhem-se aos embriões zigóticos em muitos aspectos (DODEMAN et al., 1997; VON ARNOLD et al., 2002; FÉHER et al., 2003) e seja possível estudar diversos processos da embriogênese usando o sistema de embriogênese somática, outros pontos não podem ser estudados, incluindo o momento da fertilização, a

diferenciação do endosperma, a absorção de nutrientes provenientes do endosperma bem como sua interação com o embrião, o efeito do tecido materno sobre o desenvolvimento do embrião e a dessecação e dormência do embrião (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2006).

Aliada às técnicas de transformação genética, a embriogênese somática pode ser uma importante ferramenta para o melhoramento genético das mais variadas espécies de plantas de valor comercial.

As técnicas atuais de produção de embriões somáticos embora muito úteis para a propagação são ineficazes se a intenção é a produção em larga escala. Os métodos convencionais requerem muita mão-de-obra e um intenso cuidado com as culturas, pois as condições de cultivo mudam constantemente.

A automação pode reduzir o labor necessário para a produção em larga escala e ainda ter um impacto positivo na produtividade dos embriões, uma vez que os bioreatores podem separar os embriões, massas e células embriogênicas em seu meio adequado de desenvolvimento, sincronizando a produção dos mesmos. Além disso, em um processo de cultivo automatizado usando um bioreator, os parâmetros de cultivo, como pH e concentração de oxigênio dissolvido podem ser monitorados e controlados de forma mais eficiente do que pode ser feito em uma cultura usando frascos de cultivo (IBARAKI & KURATA, 2001).

Por um longo tempo, a embriogênese somática foi estudada em várias culturas, destacando-se a cenoura (*Daucus carota* L.) (KOMAMINE et al., 1990). Os autores descreveram originalmente o sistema com as suas terminologias próprias. O termo célula embriogênica deve ser empregado a células que alcançaram a transição de célula somática para um estágio onde não se necessita nenhum estímulo externo para produzir um embrião somático. Estas células são pequenas, arredondadas e possuem o citoplasma denso (KOMAMINE et al., 1990).

O processo de embriogênese *in vitro* requer a indução de competência embriogênica em células que não são naturalmente embriogênicas. Competência embriogênica é o termo dado a habilidade de determinadas células de um determinado tecido de um determinado genótipo de formar embriões somáticos. A aquisição de competência embriogênica envolve uma fase de indução para a qual não existe contraparte na embriogênese zigótica (DODEMAN et al., 1997).

As células competentes geralmente estão presentes em massas pró-embriogênicas (MPEs) que são formadas em meio suplementado com auxinas. A auxina é o fator mais importante para a indução e tem diferentes efeitos nas diferentes fases da embriogênese. A presença de 2,4-D ou outras auxinas é necessária para a formação das MPEs a partir de

células isoladas. Isto mostra que a auxina é um fator essencial para a indução da embriogênese. Em outras palavras, auxina é necessária para as células competentes expressarem totipotência. Entretanto a presença de auxinas sintéticas no meio após a aquisição de competência tem um efeito inibitório sobre a formação de embriões somáticos a partir das MPEs (KOMAMINE et al., 1990).

Em alguns casos os embriões somáticos ou as culturas embriogênicas podem ser criopreservadas, o que torna possível o estabelecimento de bancos gênicos. Danso e Lloyd, 2004 desenvolveram um protocolo de criopreservação de calos embriogênicos de mandioca usando sacarose (crioprotetor) seguida por dessecação. Os calos criopreservados mantiveram capacidade de originar embriões somáticos similar aos calos não criopreservados mesmo quando conservados por longos períodos.

Muito progresso já foi feito no que diz respeito à otimização de protocolos utilizados, porém alguns tratamentos têm causado efeitos indesejáveis sobre os embriões como a má formação de meristemas, o fusionamento de cotilédones e outros que impossibilitam a germinação desses embriões. Esses efeitos são geralmente atribuídos às auxinas sintéticas usadas no período de indução. A fim de regular eficientemente a formação de plantas via embriogênese somática é importante entender como os embriões somáticos se desenvolvem e como o desenvolvimento é influenciado pelos diferentes tratamentos químicos e físicos. Tal conhecimento pode ser obtido pela construção de mapas de destino representando um número adequado de marcadores especificando estágios críticos do desenvolvimento. Baseado nesse mapa de destino é possível desenvolver um modelo do processo.

Os mecanismos que controlam a diferenciação celular durante a ES estão longe de serem entendidos, entretanto moléculas sinais solúveis secretadas executam uma importante regra. Meios de cultura condicionados obtidos de culturas embriogênicas podem promover a embriogênese. Compostos ativos nesse meio condicionado incluem endoquitinases, proteínas arabinogalactano e lipoquitoligossacarídeos (VON ARNOLD et al., 2002).

Existem dois padrões de indução de embriogênese somática: embriogênese somática direta (ESD) e embriogênese somática indireta (ESI). ESD se caracteriza por formação de embriões somáticos sem a proliferação de calos enquanto que a ESI se caracteriza por uma intensa proliferação de calos antes da formação de embriões somáticos. Em ambos os casos, o embrião somático segue uma seqüência de desenvolvimento similar à do embrião zigótico (VON ARNOLD et al., 2002). Na ESD células competentes já estão presentes e a expressão do programa embriogênico depende meramente de condições favoráveis necessitando de uma reprogramação mínima (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2006). Na ESI uma reprogramação

celular maior é necessária para ocorrer a desdiferenciação e aquisição de competência embriogênica (WILLIAMS & MAHESWARAN, 1986). Os principais fatores envolvidos em cada caso dependem da natureza e concentração dos reguladores de crescimento empregados, do tipo e o estado fisiológico do explante entre outros.

Os embriões somáticos também podem ser originados tanto pela via unicelular quanto pela via multicelular. Quando os embriões somáticos têm uma origem unicelular, observam-se divisões celulares coordenadas e o embrião muitas vezes está conectado com o tecido materno por uma estrutura semelhante a um suspensor (WILLIAMS & MAHESWARAN, 1986). Em contraste, embriões originados pela via multicelular são inicialmente observados como uma protuberância; não apresentam divisões celulares coordenadas e estão tipicamente fusionados com o tecido materno pela sua parte basal (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2006).

Na ESD as duas vias, origem unicelular e origem multicelular já foram observadas. Até na mesma espécie de plantas ambas as vias de desenvolvimento foram observadas durante a ESD (WILLIAMS & MAHESWARAN, 1986) e a ESI (FAURE et al., 1996; FERNANDEZ et al., 1999; QUIROZ-FIGUEROA et al., 2002a).

### **1.3. Embriogênese somática em plantas leguminosas**

As leguminosas incluem muitas culturas importantes que são fontes de proteínas na dieta de muitas pessoas ao redor do mundo. Os legumes também são usados na produção de óleos, como forragem para animais e como adubo verde. Uma característica das plantas leguminosas que está se tornando cada vez mais importante à medida que as fontes de energia diminuem e o preço dos fertilizantes nitrogenados aumenta é a fixação de nitrogênio, algo que poucas plantas podem fazer. Por esses motivos, os legumes ocupam papel de destaque na agricultura e estão cada vez mais presentes nos programas de melhoramento genético.

O estabelecimento de protocolos de regeneração é o alicerce para a transformação genética de qualquer espécie de planta. A obtenção destes protocolos de regeneração em plantas leguminosas é uma tarefa particularmente difícil devido à natureza recalcitrante das plantas desta família e por isso o desenvolvimento de protocolos de regeneração e transformação genética é uma tarefa que permanece longe de ser rotineira apesar dos esforços de vários grupos de pesquisa.

A falta de um sistema modelo de embriogênese em plantas leguminosas é algo que tem limitado a aplicação das técnicas de cultura de tecidos a essas plantas. Os sistemas de embriogênese somática em plantas leguminosas desenvolvidos até hoje estão limitados às

espécies mais importantes economicamente como a soja (MEURER et al., 2001), a alfafa (MONTEIRO et al., 2003) e o amendoim (LITTLE et al., 2000). Apesar de existirem protocolos de regeneração bem estabelecidos em soja, estes protocolos não são aplicáveis a uma ampla variedade de genótipos (PARROT et al., 1989, MEURER et al., 2001). Até o momento, um número limitado de cultivares de soja apresentou boas respostas em sistemas embriogênicos (SIMMONDS & DONALDSON, 2000). A variação de resposta entre cultivares de uma mesma espécie é algo comum e tem limitado muito a aplicabilidade dos protocolos produzidos em cultivares de diferentes regiões geográficas.

Consultando a literatura o que se observa é que a indução de calos embriogênicos em leguminosas é feita a partir de tecidos meristemáticos jovens como embriões zigóticos imaturos, folhas em desenvolvimento e cotilédones. Porém, a embriogênese somática já foi observada nos mais variados explantes como ápices caulinares, pecíolos, hipocótilos, e protoplastos em diferentes espécies de leguminosas (LAKSHMANAN & TAJI, 2000). A escolha do explante é um fator fundamental para se ter sucesso nos experimentos de cultura de tecidos.

Na maioria das espécies estudadas o 2,4-D e o 2,4,5-T foram utilizados como compostos indutores, entretanto alguns reguladores de crescimento de nova geração como o thidiazuron (SINGH et al., 2003) tem sido utilizados como alternativa de sucesso aos ácidos clorofenoxiacéticos. O thidiazuron tem a vantagem de estimular o processo direto de embriogênese até em explantes provenientes de tecidos com certo grau de diferenciação. As principais limitações para a aplicação das técnicas biotecnológicas modernas em leguminosas incluem a dificuldade em induzir a embriogênese somática em muitos cultivares comercialmente importantes, a baixa frequência de produção de embriões, baixa taxa de germinação e conversão em plantas e a variação somaclonal (LAKSHMANAN & TAJI 2000) que ocorre principalmente no modelo indireto de embriogênese. Essas limitações podem ser reduzidas em um futuro próximo com o uso de novos reguladores de crescimento e principalmente com o advento da biologia molecular.

#### **1.4. Embriogênese somática em feijão-de-corda**

Existem poucos trabalhos na literatura sobre a embriogênese somática do feijão-de-corda devido à dificuldade de regeneração apresentada por esta espécie. Kulothungan et al., 1995 desenvolveram um protocolo de embriogênese somática onde folhas primárias foram incubadas em meio MS (MURASHIGE & SKOOG 1962) sólido suplementado com 2,4-D.

Formação de calos friáveis foi observada nas regiões seccionadas dos explantes em contato com o meio de cultura. Os calos foram transferidos para uma suspensão celular com níveis idênticos de 2,4-D e a formação de embriões somáticos ocorreu. A conversão dos embriões em plantas foi conseguida após a transferência dos embriões somáticos para um meio contendo uma menor concentração de 2,4-D do que a utilizada anteriormente. O processo completo de embriogênese somática foi conseguido na presença de 2,4-D como único regulador de crescimento, porém com baixa frequência de regeneração (3,2%).

Li et al., 1995 conseguiram regenerar o feijão-de-corda a partir da cultura de protoplastos em meio MS líquido modificado, suplementado com 0,2 mg/L de 2,4-D, 1,0 mg/L de ANA e 0,5 mg/L de Benzilaminopurina (BAP). Os protoplastos foram isolados a partir de vagens imaturas com 10 a 15 dias após a antese. O calo formado foi transferido para o meio MSB (Sais MS e vitaminas B5) contendo 500mg/L de NaCl, 500 mg/L de hidrolisado de caseína, 2 mg/L 2,4-D e 0,5mg/L de BAP para proliferação e aproximadamente 5% dos calos se desenvolveram em setores embriogênicos. A regeneração ocorreu em meio MSB suplementado com 0,1 mg/L de Ácido indol acético (AIA), 0,5 mg/L de Cinetina (Cin), 3 a 5% de manitol e 2% de sacarose. Os embriões formados germinaram em uma frequência de 10 a 15%.

Em 2000 Anand et al., pertencente ao mesmo grupo de pesquisa introduziram algumas mudanças nesse protocolo para aumentar a frequência de regeneração de plantas. As mudanças consistiam na adição de compostos nitrogenados (100 mg/L de L-Glutamina e de Hidrolisado de caseína) ao meio de cultura, diminuição da concentração de 2,4-D nas suspensões celulares em relação ao meio de indução de calos, uso de ABA e D-Manitol no meio de maturação e uso de zeatina, ABA e D-Manitol no meio de germinação. A frequência de plantas (21,8%) obtidas neste protocolo foi aumentada em relação ao experimento anterior, mas após a transferência para o solo somente 8 a 10% das plantas sobreviveram.

Gonçalves, 2004 utilizou embriões zigóticos maduros e imaturos e folhas primárias como explante inicial para a indução de embriogênese somática no feijão-de-corda. Calos embriogênicos e embriões somáticos em diversos estádios de desenvolvimento foram obtidos, entretanto não houve conversão destes em plantas. Em meio sólido, folhas primárias originaram as melhores respostas na indução de calos embriogênicos no meio MS completo suplementado com 3% de sacarose, 100 mg/L de L-glutamina, 100 mg/L de hidrolisado de caseína, 0,7% de ágar, 0,5 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e pH 5,8. Já nas suspensões celulares, eixos embrionários de embriões zigóticos maduros foram os que mais originaram estruturas embrionárias no meio MS completo suplementado com 3% de sacarose

e 0,5 mg/L de 2,4-D, 0,1 mg/L de Cinetina (Cin) e pH 5,8. Também foram determinadas as concentrações ideais dos herbicidas glufosinato de amônio e imazapyr e do antibiótico canamicina capazes de impedir o desenvolvimento de calos embriogênicos a partir de calos e de eixos embrionários de embriões zigóticos do feijão-de-corda.

Abreu, 2004 desenvolveu um trabalho comparativo entre a embriogênese zigótica e somática no feijão-de-corda cv. Pitiúba. Estruturas semelhantes a embriões somáticos foram obtidas em suspensão celular composta de meio MS completo suplementado com 3% de sacarose, 0,5 mg/L de 2,4-D, 0,1 mg/L de Cinetina (Cin) e pH 5,8. Embriões zigóticos foram coletados de vagens imaturas durante o período de desenvolvimento dos embriões. Os cortes histológicos mostraram que as estruturas não apresentavam uma protoderme bem definida nem uma clara bipolaridade não podendo ser considerados embriões somáticos.

Ramakrishnan et al., 2005a, cujo grupo de pesquisa se localiza na mesma cidade da Índia do grupo anterior desenvolveu um protocolo de regeneração via embriogênese somática muito similar ao de Anand et al., 2000. As modificações incluem um aumento na concentração de Hidrolisado de caseína de 100 para 150 mg/L, o uso de Prolina no meio de maturação que era composto de sais B5 (GAMBORG et al., 1968) ao invés de MS usado por Anand et al. 2000 e o desenvolvimento de plantas se deu no meio B5 meia força suplementado com 3% de maltose, 2500 mg/L de nitrato de potássio e 0,05 mg/L de thidiazuron (TDZ) com uma frequência de 32% de regeneração.

O mesmo grupo supracitado (RAMAKRISHNAN et al., 2005b) também desenvolveu o que parece ser o primeiro trabalho histológico sobre a embriogênese somática em feijão-de-corda. Foi observado que as células envolvidas com a formação das massas pró-embriogênicas faziam parte do mesofilo foliar. Os embriões somáticos obtidos mostraram uma protoderme e clara bipolaridade.

Até agora os trabalhos mostraram que a embriogênese somática em feijão de corda pode ser obtida em meio MS suplementado com 2,4-D em concentrações de 0,5 a 1,5 mg/L. Compostos nitrogenados adicionados ao meio aumentam a frequência de regeneração de plantas que ainda é baixa. Os protocolos estabelecidos também apresentam a desvantagem de não ser aplicáveis a uma grande quantidade de genótipos. Além disso, os trabalhos realizados até agora ainda não foram confirmados por outros grupos de pesquisa.

O estabelecimento de protocolos de regeneração aliado às ferramentas biotecnológicas pode ajudar a desenvolver novas variedades de feijão-de-corda contendo genes de interesse agrônômico que aumentem seu desempenho de produção de grãos e ainda o torne resistente às principais pragas que atacam essa espécie. Contudo o estabelecimento desses protocolos tem

se mostrado uma tarefa árdua principalmente pela natureza recalcitrante das plantas leguminosas. A obtenção de plantas transformadas com genes de resistência às pragas e tolerância à seca pode elevar bastante a produção, além de dispensar o uso de agrotóxicos diminuindo os riscos ambientais e ainda reduzindo os custos (EHLERS AND HALL 1997).

Os estudos que aumentem o conhecimento sobre a regeneração em feijão-de-corda associadas às ferramentas biotecnológicas contribuirão para acelerar o desenvolvimento de variedades com características agronômicas ideais.

Diante desse cenário esse estudo foi conduzido com o objetivo de regenerar o feijão-de-corda cv. Pitiúba via embriogênese somática. Foram conduzidos experimentos para estabelecer culturas de calos. Posteriormente linhagens de calos embriogênicos foram isoladas e as condições de cultivo para esses calos em meio líquido foram estabelecidas. Os calos potencialmente embriogênicos foram também submetidos à condições de cultivo que estimulam o desenvolvimento de embriões somáticos.

## **1.5. Indução de embriogênese somática**

### **1.5.1. O Estresse**

Como mostrado por diversas observações experimentais o destino de diferenciação das células vegetais dependente da informação posicional e de sinais de desenvolvimento vindos das células vizinhas pode ser facilmente alterado em condições de cultivo *in vitro*. Mudanças drásticas no ambiente celular, tais como exposição das células ou tecidos a condições nutricionais ou hormonais abaixo das ideais, por exemplo, fornecem um estresse significativo que, por si só, é capaz de desencadear o processo. A resposta às condições estressantes depende de dois parâmetros principais: o nível do estresse e o estado fisiológico das células. Se o nível de estresse excede a tolerância celular, a célula morre, em contraste, níveis baixos de estresse podem acelerar o metabolismo e induzir mecanismos de adaptação. As adaptações incluem a reprogramação da expressão gênica, mudanças no metabolismo e na fisiologia das células.

As condições de cultura de tecidos *in vitro* submetem as células a um estresse significativo, pois estas são removidas dos seus ambientes teciduais originais e são colocadas em meios de cultura sintéticos, contendo concentrações não fisiológicas de reguladores de crescimento, sais e componentes orgânicos. A injúria, por si só, é um sinal significativo na indução de desdiferenciação. Em protoplastos foliares de alfafa, compostos que induzem o

estresse oxidativo aumentam o nível celular endógeno de auxina e promove a dediferenciação, indicada pela rápida acidificação do meio e pela divisão celular em células de menores (PASTERNAK et al., 2002). A dediferenciação em muitos casos pode ser claramente correlacionada com o estresse e/ou a resposta à auxina das células.

O estresse não somente promove a dediferenciação, como também pode ser usado para induzir a formação de embriões somáticos. A cascata de fosforilação da MAPK (Mitogen-activated protein kinase) pode ligar as respostas ao estresse oxidativo à sinalização da auxina e a regulação do ciclo celular como revisado por Hirt et al., 2000. Por exemplo, a MAPK quinase quinase (MAPKKK) de tabaco NPK1, pode estar envolvida na resposta ao estresse oxidativo, sinalização de auxina, e regulação do ciclo celular. Injúria, alta concentração de sal, íons de metais pesados ou estresse osmótico influenciam positivamente a indução de embriogênese somática em diversas espécies de plantas. Esses procedimentos foram acompanhados por um aumento na expressão de diversos genes relacionados ao estresse, dando suporte a hipótese de que a embriogênese somática é um processo de adaptação das células vegetais cultivadas *in vitro* (FEHÉR et al., 2002).

#### 1.5.2. Reguladores de crescimento e fito-hormônios

Os hormônios são as moléculas mais relacionadas com as mudanças de desenvolvimento. Auxinas e citocininas são os principais reguladores de crescimento de plantas envolvidos na regulação da divisão celular e diferenciação. A influência da aplicação de auxinas exógenas, preferencialmente 2,4-D na indução de embriogênese somática está bem documentada na literatura. Entretanto o desenvolvimento de embriões em tecidos somáticos foi também relatado na ausência de reguladores de crescimento (CHOI et al., 1998) bem como na presença de outros reguladores de crescimento como citocininas (SAGARE et al., 2000) e ácido abscísico (NISHIWAKI et al., 2000). Indutores não hormonais também podem ser usados para a transição de célula somática para célula embriogênica. Tais indutores incluem alta concentração de sacarose ou estresse osmótico, íons de metais pesados (PASTERNAK et al., 2002) e alta temperatura. Na maioria dos casos onde não se usa reguladores de crescimento para a indução de embriogênese, os embriões somáticos são formados diretamente na superfície do explante sem formação de calos – Embriogênese Direta (FEHÉR et al., 2003).

Baseado na grande variedade de tipos indutores, a embriogênese somática não pode ser definida como resposta específica a um ou mais reguladores de crescimento aplicados e

sim como o efeito estressante que estes podem causar às células desencadeando os mecanismos de adaptação que levam a formação dos embriões somáticos. Os níveis de hormônios endógenos podem ser considerados, entretanto, como os principais fatores na determinação da especificidade da resposta celular aos estímulos de estresse. Recentemente uma quantidade substancial de observações experimentais foi acumulada com respeito aos papéis centrais que os níveis endógenos de ácido indol-acético (AIA) e ácido abscísico (ABA) exercem durante as fases iniciais da embriogênese (FEHÉR et al., 2003).

Além do requerimento absoluto de auxina exógena para sustentar o crescimento de culturas *in vitro*, as células vegetais podem produzir quantidades substanciais da auxina nativa, AIA. Altos níveis de AIA endógenos estão associados com o aumento da resposta embriogênica em algumas espécies de plantas (JIMENEZ & BANGERTH 2001a, b; JIMENEZ 2001). Em cultura de calos de cenoura a adição de 2,4-D levou a um aumento no nível de auxina endógena AIA (MICHALCZUK et al., 1992). Os autores sugeriram que a competência embriogênica das células de cenoura está relacionada com este grande aumento no nível da auxina endógena AIA estimulada por 2,4-D e que o composto sintético age indiretamente perturbando o metabolismo da auxina endógena, sendo seu efeito direto de menor significância.

Em protoplastos de alfafa cultivados na presença de 2,4-D, o nível endógeno de AIA aumentou consideravelmente durante os três primeiros dias de cultivo (PASTERNAK et al., 2002). Esse aumento foi transiente e ocorreu tanto em condições embriogênicas (alta concentração de 2,4-D, estresse causado por ferro,) quanto em condições não embriogênicas (baixa concentração de 2,4-D, tamponamento do meio de cultura), entretanto o tempo do pico de síntese de AIA apresentou um atraso de um dia em condições não-embriogênicas (PASTERNAK et al., 2002).

Um pico similar no nível de AIA endógeno foi observado em embriões zigóticos imaturos de girassol cultivados sob condições embriogênicas (CHARRIÉRE et al., 1999). Nesse sistema, as células podem ser induzidas a formar embriões somáticos ou partes aéreas modificando apenas a concentração de sacarose no meio de cultura. Os tecidos crescidos sob condições embriogênicas mostraram um aumento de 4 vezes no conteúdo de AIA comparados aos cultivados sob condições não embriogênicas. O momento do pico (aproximadamente 24 h de cultivo) foi bem correlacionado com o tempo da determinação irreversível da resposta morfogênica. A localização de AIA por imunocitoquímica nos embriões zigóticos imaturos, antes, durante e depois da indução do desenvolvimento de embriões somáticos mostra

evidências diretas de que um pulso endógeno de auxina pode ser um dos primeiros sinais de competência embriogênica (THOMAS et al., 2002).

Uma oscilação repentina na concentração de auxina também foi relatada logo após a fertilização em zigotos de cenoura, enfatizando a significância das mudanças temporais nos níveis de auxina endógena sobre a expressão da totipotência celular (RIBNICKY et al., 2002). O transporte polar de auxina endógena mostrou ser um importante fator na formação de embriões somáticos em mostarda indiana (LIU et al., 1993) e ginseng (CHOI et al., 1997). O uso de inibidores da ação das auxinas levou à má formação de embriões somáticos. As observações sugerem que mudanças espaciais e temporais nos níveis de auxina endógena são fatores importantes que controlam o destino das células embriogênicas.

Entre os diferentes análogos de auxinas usados para a indução de embriogênese somática o 2,4-D é de longe o mais eficiente e por isso o regulador de crescimento sintético utilizado na maioria dos protocolos de cultura de células embriogênicas. Foi sugerido na literatura que o 2,4-D acima de certa concentração (dependendo do sistema) tem um efeito duplo nessas culturas, tanto como uma auxina (diretamente ou através do metabolismo do AIA) quanto como um estressor. Grossmann, 2000 relatou a interação entre os herbicidas com ação de auxina e a vias de síntese dos hormônios relacionados ao estresse: etileno e ABA.

Em cenoura a aplicação de ácido abscísico como único regulador de crescimento ao meio de cultivo de plântulas levou a formação de embriões somáticos na superfície dos hipocótilos destas plântulas (NISHIWAKI et al., 2000). Entretanto a resposta era dependente da presença do meristema apical, a principal fonte de auxina nas plântulas. Essas observações sugerem que o sinal estressante provocado pelo ABA exógeno só foi efetivo na presença de um fonte de auxina endógena. O nível de AIA endógeno foi influenciado (aumentado) pela aplicação de ABA à cultura de embriões zigóticos imaturos de girassol e induziu a formação de embriões somáticos sob concentrações de sacarose que de outra maneira promoveriam a formação de partes aéreas (CHARRIÉRE et al., 1999). O efeito do ABA sobre a indução de embriogênese somática foi primeiro demonstrado por Senger et al., 2001. Os autores usaram diferentes abordagens para reduzir os níveis celulares de ABA o que levou a uma perturbação da morfogênese que pôde ser revertida com a aplicação de ABA exógeno.

As observações experimentais acima descritas enfatizam a interação entre auxina e estresse/ ABA. A ativação simultânea das respostas a auxina e ao estresse podem ser eventos chave na adaptação celular, causando uma reprogramação genética, metabólica e fisiológica as quais resultam na expressão de competência embriogênica das células somáticas de plantas (FEHÉR et al., 2003).

### 1.5.3. Moléculas secretadas

Os mecanismos precisos que controlam a diferenciação celular em embriões somáticos ainda estão longe de ser bem entendidos, apesar disso existem algumas evidências de que algumas moléculas sinais solúveis estejam envolvidas. Há muito se sabe que um meio condicionado por culturas embriogênicas pode promover a embriogênese em culturas não embriogênicas. Essa habilidade do meio condicionado de promover a embriogênese somática implica que as moléculas sinais secretadas desempenham um importante papel no processo.

A parede celular participa no crescimento e diferenciação das células durante a embriogênese em plantas. Produtos derivados da hidrólise de componentes específicos da parede celular agem como moléculas sinalizadoras de curta distância no desenvolvimento e algumas delas participam da regulação da embriogênese. Para confirmar que a parede celular possui alguns determinantes da embriogênese somática, estudos foram conduzidos em culturas *in vitro* de milho através da coloração histoquímica com o reagente de Yariv. Esses estudos revelaram que a parede celular das células embriogênicas contém proteínas arabinogalactano (AGPs) enquanto que as células não embriogênicas não contém. Samaj et al., 1999, demonstraram que esses tecidos embriogênicos apresentam nas proteínas arabinogalactano da matriz extracelular um epítipo que reconhece o anticorpo monoclonal JIM4 enquanto que os tecidos não embriogênicos não apresentam. A adição do reagente de Yariv ao meio de cultura bloqueou a indução de embriogênese somática, porém a transferência do tecido tratado para o meio fresco sem a presença do reagente restabeleceu o processo (CHAPMAN et al., 2000) sugerindo uma função importante das AGPs na indução de embriogênese somática (MAJEWSKA-SAWKA & NOTHNAGEL 2000).

#### 1.5.3.1. Proteínas extracelulares

A secreção de proteínas no meio de crescimento já foi relatada em algumas espécies. Entretanto, poucos relatos provam que alguma proteína específica secretada tenha um efeito direto sobre o desenvolvimento de embriões somáticos. Uma das proteínas que promovem o desenvolvimento de embriões somáticos em culturas embriogênicas de cenoura foi identificada no ano de 1992 por de Jong e colaboradores como sendo uma endoquitinase acidífera glicosilada. Os autores estudavam a variante termo-sensível *ts11* que tem seu desenvolvimento paralisado no estágio globular em temperaturas não permissivas. A adição

dessa endoquitinase ao meio de cultivo permite o desenvolvimento dos embriões. Segundo von Arnold et al., 2002 a expressão do gene da endoquitinase está restrita a um tipo especializado de células que tem funções nutricionais na embriogênese. A presença desse tipo especializada de células pode ser observada ao se espalhar um calo embriogênico no meio de cultivo. O calo que foi espalhado não irá crescer, porém ao juntar um pouco esse calo espalhado pode se observar o crescimento das massas. Isso indica a presença de tipos celulares especializados nas massas envolvidos na nutrição ou na secreção de sinais para as outras células que vão originar o embrião.

O papel exato das quitinases na embriogênese somática ainda não é claro. Entretanto, tem sido sugerido que elas estejam envolvidas na clivagem de moléculas sinalizadoras obtidas a partir de um substrato ainda não conhecido (VON ARNOLD et al., 2002).

#### 1.5.3.2. Proteínas arabinogalactano (AGPs)

Proteínas Arabinogalactano têm sido relacionadas com o desenvolvimento de embriões somáticos. AGPs são um grupo heterogêneo de macromoléculas estruturalmente complexas compostas de um peptídeo, uma larga cadeia glicana ramificada e um lipídio. Elas são distinguidas pela sua alta razão carboidrato-proteína, muitas vezes mais do que 90% da macromolécula consiste de carboidratos. AGPs estão presentes nas paredes celulares e membranas plasmáticas e são comumente encontradas no meio de cultivo. Sua localização sugere uma função sinalizadora.

A perturbação da concentração de AGPs disponíveis no meio de cultivo tem efeito sobre a embriogênese somática indicando que as AGPs são importantes para o desenvolvimento do embrião. Na revisão feita por von Arnold et al., 2002 contam exemplos de trabalhos com cenoura em que uma diminuição da disponibilidade de AGPs no meio levam a uma redução na formação de embriões somáticos. Além disso, a adição de AGPs em culturas celulares que perderam o potencial embriogênico leva a promoção da embriogênese somática.

#### 1.5.3.3. Lipoquitooligossacarídeos (LCOs)

LCOs é uma classe de moléculas sinalizadoras que promovem a divisão de células de plantas. Fator de nodulação é um tipo de LCOs secretados por *Rhizobium*, e que induzem a divisão celular nas células do córtex da raiz possibilitando a formação dos nódulos. Fatores de

nodulação produzidos por diferentes espécies de *Rhizobium* consistem uniformemente de um esqueleto de oligossacarídeo com resíduos de N-acetil-D-glucosamina ligados na posição 1,4 variando entre três a cinco unidades de açúcar de distância entre os resíduos e sempre carregam uma cadeia N-acil na extremidade não redutora. Essa estrutura básica é essencial para o sucesso da infecção e formação dos nódulos.

Algumas linhas de evidências sugerem o envolvimento de LCOs na regulação do desenvolvimento de embriões somáticos. Fatores de nodulação de *Rhizobium* promovem o desenvolvimento de PEMs a partir de pequenos agregados de células em *Picea abies* (FILONOVA et al., 2000).

Segundo von Arnold et al., 2002, os fatores de nodulação podem substituir auxina e citocinina na promoção da divisão das células embriogênicas. Além disso, existem evidências de que os fatores de nodulação podem substituir as quitinases no seu efeito sobre o desenvolvimento de embriões somáticos indicando uma convergência nas suas vias de sinalização.

## **1.6. Aspectos moleculares da embriogênese**

### 1.6.1. Expressão gênica durante a embriogênese zigótica

Durante a embriogênese o padrão morfogênético da planta e dos tecidos meristemáticos requeridos para o desenvolvimento pós-embriogênico são estabelecidos. Vários genes devem ser expressos de maneira altamente coordenada para assegurar que o zigoto unicelular se desenvolva em uma estrutura multicelular organizada (VON ARNOLD et al., 2002).

Apesar da localização do embrião nos órgãos florais tornar difícil o acesso à manipulação experimental; nos últimos anos têm se tornado possível isolar células ovo de plantas e conduzir sua fertilização *in vitro* com o objetivo de investigar os eventos iniciais da embriogênese em plantas. Além disso, abordagens genéticas têm sido usadas para identificar os genes necessários para vários processos embriogênicos incluindo a formação de padrão.

A característica geral da expressão das seqüências de mRNAs específicas do embrião é que elas aparecem e decaem várias vezes durante os diferentes estágios da embriogênese. Isso indica que cada grupo de genes é controlado por sinais reguladores específicos, porém não se sabe ao certo o que causa a ativação destes genes em estágios específicos do desenvolvimento embrionário.

O envolvimento dos genes homeobox foi demonstrado primeiramente pela análise do mutante *stm* de *Arabidopsis*. *SHOOTMERISTEMLESS (STM)* codifica para uma proteína homeobox tipo KNOTTED1 (KN1) e é expresso na região do meristema apical durante a embriogênese. Outro exemplo de gene homeobox é o gene *ATML1*, que pertence ao grupo de fatores de transcrição homeodomínio zíper de leucina (HD-Zip) o qual é expresso especificamente na célula apical após a primeira divisão do zigoto.

O gene *PEII* codifica para uma proteína contendo um domínio Cys3His dedo de zinco (Zinc finger) associado com vários fatores de transcrição animais e fúngicos. Estudos de hibridização *in situ* mostraram que *PEII* é expresso durante o desenvolvimento embrionário do estágio globular até o cotiledonar. A sua função é crítica durante a transição do embrião globular-cordiforme, uma vez que plantas transgênicas de *Arabidopsis* expressando o gene *PEII* antisenso não conseguem avançar do estágio cordiforme (LI AND THOMAS, 1998).

Conforme habilmente revisado por von Arnold et al., 2002, a caracterização da expressão gênica durante o desenvolvimento, maturação e germinação do embrião levou a identificação de cinco classes distintas de genes regulados durante o desenvolvimento de angiospermas: Classe 1. Genes constitutivamente expressados, os produtos destes genes estão presentes durante todos os estágios e tem funções fundamentais durante o crescimento normal da planta. Classe 2. Genes específicos do embrião, a expressão de tais genes é restrita ao embrião e cessa antes ou durante a germinação. Classe 3. Genes altamente expressados durante os estágios iniciais da embriogênese até o estágio cotiledonar. Classe 4. Genes representando proteínas da semente, expressados durante a expansão dos cotilédones e maturação da semente. Classe 5. Genes expressos abundantemente nos estágios finais da embriogênese até a maturação da semente. Esses genes são ativados por ABA.

#### 1.6.2. Embriões zigóticos mutantes e a elucidação dos mecanismos da embriogênese

A manipulação genética de *Arabidopsis thaliana* por mutagênese química e inserção mutacional tornou possível identificar um grande número de mutantes que têm o seu desenvolvimento paralisado em diferentes etapas da embriogênese (GOLDBERG et al., 1994). Esse tipo de abordagem aumentou o entendimento da atividade funcional de diversos genes que não puderam ser investigados por outras técnicas. Mutações em genes que regulam o desenvolvimento embrionário ou a formação de padrão foram estudadas e ajudaram na identificação de novos genes e classes específicas de genes.

A análise genética de diferentes mutantes levou a conclusão de que três elementos básicos do desenvolvimento do embrião, isto é, formação de padrão, morfogênese e citodiferenciação, são reguladas independentemente (VON ARNOLD et al., 2002). Muitos desses mutantes que têm seu desenvolvimento precocemente bloqueado parecem ser afetados nas funções básicas de manutenção (Housekeeping) que são essenciais durante os estágios iniciais da embriogênese. Alguns desses mutantes têm defeitos em funções básicas como a biossíntese de biotina (*bio 1*), divisão celular e expansão celular (*EMB30*) e corte e emenda dos introns (intron splicing) (*sus2*).

Outros mutantes são defectivos em genes relacionados diretamente com o crescimento e o desenvolvimento da planta. Durante o desenvolvimento do embrião três domínios espaciais são formados ao longo do eixo longitudinal: o domínio apical, composto de cotilédones, ápice caulinar, e a parte superior do hipocótilo, o domínio central inclui a maior parte do hipocótilo e o domínio basal consiste primariamente da raiz (VON ARNOLD et al., 2002). A evidência para existência desses domínios foi confirmada pela análise de diversos mutantes que não apresenta algum desses domínios embrionários. Seis mutantes do padrão apical-basal foram descritos em *Arabidopsis*, chamados *gnom*, *gurke*, *fackel*, *monopteros*, *rootless* e *shoot-meristemless*. Três mutantes mostrando defeitos radiais (*keule*, *knolle* e *raspberry*) e três mostrando formas alteradas também foram identificados (DODEMAN et al., 1997). Apesar de os mecanismos detalhados da formação do eixo apical-basal não estarem bem entendidos, foi sugerido por Mayer & Jugens et al., 1998 que pode ser originado de uma polarização intrínseca do zigoto, com o tecido adjacente possivelmente influenciando a orientação do eixo.

*SHOOTMERISTEMLESS* é um gene cujo produto é importante para a formação do meristema apical em *Arabidopsis*. Na ausência do produto deste gene o meristema apical não se forma no ponto entre os cotilédones durante a embriogênese. O gene *STM* é suficiente para a formação do meristema, pois quando este gene é expresso ectopicamente em folhas, muitos meristemas ectópicos são formados. Portanto é importante que a ativação e repressão deste gene sejam controladas de maneira cuidadosa. Outra conclusão que se pode tirar destas informações é que os cotilédones não necessitam do meristema apical e nem do produto gênico *STM* para serem formados.

Alguns genes que tem um papel regulador sobre a expressão do gene *STM* foram identificados. O gene *TOPLESS* está envolvido no estabelecimento da polaridade apical-basal no embrião. O mutante *topless* apresenta formação de raízes em ambos os pólos do embrião.

Transcritos associados com a formação do meristema apical, incluindo aqueles para o gene *STM*, não estão presentes nestes mutantes (LONG et al., 2002).

Outro gene requerido para a regulação da expressão de *STM* está no locus *PINHEAD*. Os mutantes *pinhead* formam uma estrutura semelhante a um meristema apical durante a embriogênese, porém este falso meristema dá origem a uma folha. O produto gênico *PINHEAD* porta homologia com produtos gênicos implicados no controle traducional e é possível que este gene tenha um papel na promoção da tradução de genes requeridos para a manutenção do meristema como o gene *SHOOTMERISTEMLESS* (LYNN et al., 1999).

A formação de um meristema apical é o resultado de processos sucessivos de formação de padrão iniciados muito cedo no desenvolvimento do embrião. A expressão de *WUS* no embrião de 16 células demonstra que o meristema apical se origina antes mesmo que este possa ser reconhecido histologicamente. Uma vez que o meristema apical caulinar é estabelecido, a expressão do gene *WUSCHEL* define um grupo de células localizadas em baixo das células tronco do meristema e que funcionam para manter a atividade do meristema por um mecanismo de retro-alimentação. No mutante *wuschel* as células tronco do meristema são mal especificadas e parecem sofrer diferenciação. *WUS* codifica para uma proteína homeobox que atua como um regulador traducional (MAYER et al., 1998), promovendo a manutenção das células tronco no meristema (BRAND et al. 2000). Zuo et al., 2002 identificaram um locus genético, *PGA6*, utilizando um promotor induzido por um composto químico. A mutação com ganho de função nesse locus causa uma transição de células vegetativas ou somáticas para células embriogênicas, levando ao desenvolvimento de embriões somáticos em vários tecidos e órgãos. Esse processo de reprogramação celular pode ocorrer na presença ou ausência de reguladores de crescimento, porém a concentração local de reguladores de crescimento endógeno desempenha um importante papel na transição de célula vegetativa para embriogênica. Estudos histológicos utilizando microscopia de varredura revelaram que o desenvolvimento dos embriões somáticos formados de maneira independente de reguladores de crescimento lembra em vários aspectos o desenvolvimento do embrião zigótico como exemplo a divisão assimétrica que produz duas células: a basal, maior, que origina o suspensor e a apical, menor, que origina o embrião propriamente dito (ZUO et al., 2002). Essas observações sugerem que *PGA6* desempenha um papel regulatório durante a embriogênese, estando envolvido na determinação da identidade embriogênica. Análises moleculares e genéticas mostraram que *pga6-1* e *pga6-2* são alelos do gene *WUSCHEL*. A perda de função do gene *WUS* está associada com o desenvolvimento debilitado dos meristemas apicais caulinares e florais em *Arabidopsis*, resultando na ausência destes

meristemas em todos os estágios de desenvolvimento de embriões e plantas adultas *wus* (LAUX et al., 1996; MAYER et al., 1998). Estudos genéticos revelaram que *WUS* interage com *CLAVATA (CLV)* e o circuito auto-regulatório *WUS/CLV* parece ser fundamental para a manutenção da identidade das células meristemáticas (CLARK, 2001). Essas observações sugerem que *WUS* funciona como um coordenador da especificação do destino das células meristemáticas (ZUO et al., 2002). O gene *WUS* não é expresso em células meristemáticas, sua expressão está restrita a um pequeno grupo de células embaixo das células tronco durante a embriogênese. Esse grupo de células que expressam *WUS* é chamado de centro organizador e a ausência de expressão nas células meristemáticas leva a crer que o produto deste gene atua através de um mecanismo de difusão (MAYER et al., 1998).

A observação de Zuo et al., 2002 que *WUS* é capaz de promover a transição vegetativa-embriogênica, e eventualmente a formação de embriões somáticos, sugere que essa proteína homeobox também exerce papel fundamental durante a embriogênese em adição a sua função no desenvolvimento do meristema.

Outro locus que está envolvido na regulação da atividade do meristema apical é o do gene *CLAVATA (CLV1 e CLV3)*. Ao contrário do mutante *shootmeristemless* os mutantes *clv1* e *clv3* acumulam um excesso de células indiferenciadas no meristema apical. As proteínas *CLAVATA1* e *CLAVATA3* formam um par ligante-receptor que faz um balanço entre a proliferação celular e diferenciação no meristema apical de *Arabidopsis*. *CLV1* codifica uma proteína receptora quinase e *CLV3* codifica para um pequeno polipeptídeo. *CLV3* age como ligante para *CLV1* como parte de um complexo multimérico (TROTOCHAUD et al., 2000). Os genes *CLAVATA* codificam para produtos que agem restringindo a proliferação desordenada das células tronco do meristema. Estudos com plantas transgênicas mostraram que a via dos produtos gênicos *CLAVATA* age reprimindo a atividade do fator de transcrição *WUSCHEL* (BRAND et al., 2000). Com base no exposto acima se pode concluir que os genes *WUS* e *CLV* têm papéis antagônicos na manutenção das células tronco do meristema apical de *Arabidopsis*.

Análise dos mutantes *gnom* e *monopteros* mostrou a importância das auxinas na formação de padrão e organogênese. O gene *MONOPTEROS* codifica um fator de transcrição, possivelmente envolvido na sinalização de auxina. Os mutantes *fackel* e *sterol methyltransferase1* apresentam defeitos associados com a organização corporal na semente (VON ARNOLD et al., 2002).

Análise do mutante *raspberry* mostrou que esses mutantes apresentam deficiência na transferência de sinais entre o suspensor e o embrião levando o suspensor a tomar uma rota de

diferenciação semelhante a do embrião. Esses mutantes que têm seu desenvolvimento paralisado no estágio globular mostram uma diferenciação dos seus tecidos no seu correto contexto espacial indicando que a diferenciação dos tecidos pode ocorrer independente da formação de órgãos e morfogênese (YADEGARI et al., 1994).

Estudos genéticos revelaram que em *Arabidopsis*, os loci *ABA-INSENSITIVE3 (ABI3)*, *FUSCA3 (FUS3)* e *LEAFY COTYLEDON1 (LEC1)* exercem um papel fundamental na regulação da maturação. Todos os três promovem processos específicos do embrião e simultaneamente reprimem a germinação. Eles interagem para regular vários processos durante a maturação da semente, incluindo a acumulação de clorofila, tolerância a dessecação, sensibilidade ao ABA e a expressão de proteínas de reserva. *FUS3* e *LEC1* regulam os níveis da proteína ABI1. Entretanto a mutação *lec1* é pleiotrópica. A análise dos efeitos da mutação *lec1* sobre o desenvolvimento do embrião mostrou que *LEC1* é um importante regulador do desenvolvimento do embrião que atua ativando a transcrição de genes requeridos tanto para a morfogênese quanto para a diferenciação celular (LOTAN et al., 1998).

O gene *HOBBIT (HBT)* é essencial para a formação do meristema radicular. Embriões mutantes *hbt* apresentam um desenvolvimento incorreto das células da hipófise as quais são parte das células que dão origem ao meristema radicular no embrião. Esses mutantes dão origem a plântulas que faltam uma raiz anatomicamente reconhecível (WILLEMSSEN, 1998).

Os mutantes *pickle (pkl)* apresentam um defeito na repressão do programa de desenvolvimento embriogênico após a germinação. Quando o desenvolvimento embriogênico termina, este programa precisa ser reprimido e os genes de tolerância a dessecação necessitam ser ativados. O regulador de crescimento Ácido Giberélico (GA) é conhecido pelo seu efeito em quebrar a dormência de sementes de várias espécies. Mutantes *pkl* apresentam fenótipo semelhante a plantas com defeito na biossíntese de GA. A penetrância do fenótipo *pkl* é fortemente aumentada quando os níveis endógenos de GA são reduzidos por tratamentos com inibidores da síntese de GA (OGAS et al., 1999). A clonagem e caracterização do locus *PKL* revelaram que este gene codifica para uma proteína CDH3, um fator de remodelação da cromatina que é altamente conservado nos eucariotos e atua como um regulador negativo da transcrição (OGAS et al., 1999). *LEC1*, um fator de transcrição específico da semente que promove a identidade embriogênica (LOTAN et al., 1998) é ativo em raízes *pkl*. As raízes *pkl* são raízes primárias de plantas adultas que expressam características de diferenciação embriogênica como a expressão de genes de proteínas de reserva e a acumulação de estoques de lipídios. A expressão de *LEC1* nessas raízes sugere que o produto deste gene participa na expressão do fenótipo de raiz *pkl*. Os tecidos vegetativos de *pkl* também apresentam uma

capacidade anormal de produzir embriões espontaneamente. A identificação de *PKL* como um gene codificando para uma proteína CHD3 sugere que os seus efeitos na identidade do desenvolvimento são mediados pela regulação na arquitetura da cromatina. Ele atua reprimindo a transcrição de *LECI*. O tratamento de sementes *pk1* com uniconazol-P não aumentou o nível do transcrito de *LECI* como era esperado. Isso sugere que deve existir outro fator que promove a expressão dos genes embriogênicos e que de alguma maneira é reprimido por GA. GA dessa forma apresenta dois papéis na germinação das sementes de *Arabidopsis*: Um papel já bem estabelecido é que o GA dispara a atividade metabólica e ativa o programa de desenvolvimento pós-embriogênico. O outro papel relatado no trabalho de Ogas et al., 1999 é que o GA atua na repressão dos processos de desenvolvimento embriogênicos. *PKL* media as transições de desenvolvimento moduladas por GA. A caracterização de *PKL* e a identificação de proteínas que regulem ou sejam alvos de *PKL* revelará os mecanismos de transdução de sinais induzidos por GA e o papel deste hormônio na regulação da diferenciação e do desenvolvimento em *Arabidopsis*.

### 1.6.3. Marcadores moleculares

Nos últimos tempos, com o advento da tecnologia do DNA recombinante e a PCR e suas modificações, diversos marcadores moleculares estão sendo usados para uma ampla variedade de estudos. Os marcadores moleculares incluem Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs), Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs), Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPs), Simple Sequence Repeats (SSRs) ou Sequence Tagged Microsatellite Sites (STMS), Sequence Tagged Sites (STS), DNA Amplification Fingerprinting (DAF) e Microsatellite Primed-PCR (MP-PCR) (MOHAN et al., 2004). O uso desses marcadores nos estudos de embriogênese somática pode levar ao melhor controle do processo. Marcadores de estágios específicos durante a embriogênese e que façam distinção entre calos embriogênicos e não-embriogênicos são muito úteis para aprimorar os protocolos.

Marcadores RAPD ligados a genes controlando a embriogênese somática foram identificados em alfafa (KANGFU & PAULS, 2004). O marcador foi identificado através da análise de segregação do trato embriogênese somática na geração  $F_1$  de um cruzamento entre plantas de alfafa com potencial embriogênico e plantas sem essa característica.

O uso de anticorpos monoclonais contra diferentes componentes da parede da célula vegetal bem como contra proteínas secretadas no meio de cultura são marcadores moleculares muito úteis para diferenciar células embriogênicas e não embriogênicas. Filonova et al., 2000

relataram o uso do anticorpo monoclonal JIM13 como um marcador eficiente para se distinguir entre massas pró-embriogênicas de embriões somáticos. A maioria das células nas massas pró-embriogênicas expressa o epitopo de uma proteína arabinogalactano, que é reconhecido por esse anticorpo, enquanto que embriões somáticos não expressam.

SERK é um gene muito útil na identificação de células embriogênicas em culturas celulares. Recentemente um gene homólogo a SERK foi clonado em *A. thaliana* (*AtSERK1*). A expressão desse gene está restrita a células embriogênicas e competentes bem como a embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento. Células cultivadas de plantas transgênicas expressando *AtSERK1* mostraram uma eficiência embriogênica aumentada (HECHT et al., 2001). Por outro lado segundo revisado por Quiroz-Figueroa et al., 2006 genes SERK também foram encontrados em culturas não-embriogênicas e este receptor também está relacionado com vias de transdução de sinais de defesa.

#### 1.6.4. Expressão gênica relacionada com a embriogênese somática

Durante a indução do processo embriogênico ocorre uma alteração na expressão gênica dependente de várias vias de transdução de sinais que vão atuar ativando ou reprimindo diversos grupos gênicos das células somáticas resultando na síntese de novos mRNAs e proteínas relacionados com o processo embriogênico. Essas moléculas desencadeiam uma série de respostas fisiológicas que estão envolvidas em modificar o programa de desenvolvimento dessas células possibilitando que elas manifestem seu potencial embriogênico. O advento das técnicas moleculares (bibliotecas de cDNA, análise de desenvolvimento diferencial, análises de provas subtrativas, reação em cadeia da polimerase - PCR e suas modificações) tem sido crucial na identificação de genes que apresentam expressão diferencial durante o processo. Dessa maneira vários genes estruturais e funcionais como os responsivos a hormônios, os genes homeobox, os genes LEA (Late Embryogenesis Abundant), genes codificando para Quitinases, Quinases reguladoras da embriogênese somática e muitos outros foram identificados e caracterizados (CHUGH AND KHURANA, 2002).

A estratégia mais comum para identificar genes relacionados com a embriogênese somática é comparar a expressão gênica entre embriões somáticos e células de calos. Isso levou a identificação de alguns transcritos abundantes relacionados com estágios específicos da embriogênese (Zimmermann et al., 1993). Genes expressos durante a transição de células

somáticas para um estado embriogênico também foram identificados. A maioria dos resultados é derivada de estudos com cenoura, alfafa e chicória (FEHÉR et al., 2003).

Lin et al., 1996 usando uma nova estratégia para isolar genes que tem sua expressão aumentada em embriões em desenvolvimento identificaram um grande número de diferentes clones. Os genes identificados nunca tinham sido relacionados com a embriogênese. Nove clones novos foram identificados pela primeira vez. Esses genes apresentam um padrão de expressão variado durante o desenvolvimento do embrião e alguns provaram ser úteis como marcadores moleculares para estágios específicos da embriogênese ou para a identificação de eventos de diferenciação de tecidos. Entretanto a maioria dos genes não pôde ser usada, pois apresentavam expressão tanto durante a fase de calos quanto durante o desenvolvimento embrionário. Essa limitação mostrou que a estratégia usada não foi apropriada para identificar genes característicos de estágios iniciais da embriogênese. Também foi descoberto um grupo de genes que são potencialmente regulados pós-transcricionalmente durante a embriogênese. A maioria das proteínas codificadas por esses genes podem ser classificadas nas categorias de proteínas de parede celular, enzimas, proteínas relacionadas a patogênese (PR), proteínas do choque térmico, proteínas LEA, oleosinas globulinas, histonas, proteínas ribossômicas, fator de alongação 1 $\alpha$  e ubiquitina.

#### 1.6.4.1. Genes de manutenção (Housekeeping)

Um grupo de genes está envolvido nos processos de divisão celular e formação da parede celular em vários estágios de diferenciação do embrião. As proteínas codificadas por esses genes são usualmente caracterizadas por motivos repetitivos de prolina, são ricos em glicina e mostram semelhança com as proteínas de parede celular e com aquelas envolvidas em processos do desenvolvimento. Apesar de os genes codificando para actina e tubulina também serem expressos em células não embriogênicas, durante a embriogênese o aumento na formação da membrana e da parede celular resulta na expressão aumentada desses genes (CHUGH AND KHURANA, 2002).

De maneira similar dois genes codificando para histonas, *H3-1* e *H3-11* apresentam expressão aumentada em resposta à auxina, durante a embriogênese somática em alfafa. Um cDNA específico do embrião globular codificando para o fator 1 $\alpha$  de alongação *CEM1* é encontrado em células se dividindo ativamente. A proteína codificada funciona na interação do aminoacil tRNA com ribossomos durante a síntese de proteínas que executam tarefas de manutenção (Housekeeping) nas células.

Outro gene *CEM6*, isolado por hibridização subtrativa, é especificamente expresso nos embriões somáticos de cenoura no estágio globular. A seqüência de aminoácidos da proteína codificada por *CEM6* é rica em glicina e tem um domínio hidrofóbico semelhante a uma seqüência sinal que funciona durante a biogênese da parede celular durante a embriogênese.

#### 1.6.4.2. Genes induzidos por auxina

As auxinas são conhecidas no campo de pesquisa da morfogênese de plantas pela sua habilidade de ser um potente iniciador do processo de embriogênese somática. A sua aplicação em cultura celular induz mudanças na expressão gênica de células competentes fazendo com que estas possam exibir seu potencial embriogênico.

O nível de vários mRNAs é influenciado pelo tratamento com auxina como os que codificam para certas proteínas de choque térmico (HSPs) e algumas proteínas (ciclínas) do ciclo celular. *Dchsp-1* é um dos genes induzidos por auxina que é homólogo a HSPs de baixo peso molecular e exibe expressão constante durante desenvolvimento do embrião somático (CHUGH AND KHURANA, 2002). A expressão dessas HSPs pode ser provocada pela alta concentração de auxina que é reconhecida pela célula como uma condição estressante. A exposição à auxina dispara o processo de divisão celular em células diferenciadas e promove o posterior desenvolvimento dessas células em embriões somáticos. Também é digno de nota o fato de que a transição do embrião do estágio globular para o estágio cordiforme e posterior desenvolvimento requer ou uma baixa concentração ou a completa depleção da auxina sugerindo que esse regulador de crescimento é necessário apenas para disparar o processo e a exposição por longos períodos pode comprometer o desenvolvimento de embriões somáticos.

Outra classe de genes induzidos por auxinas são os genes *SAUR* (small auxin up-regulated). Alguns cDNAs desses genes já foram isolados e seus clones foram usados como sonda (hybridization radiolabeled probes) mostrando que a auxina induz a produção de mRNAs que hibridizam com essas seqüências. Desse modo esses cDNAs que respondem à auxina podem servir como ferramenta para a separação de linhagens embriogênicas das não embriogênicas. No caso de *pJCW1* e *pJCW2*, duas sondas de cDNA que respondem a auxina, os níveis de transcritos diminuíram em culturas de embriões somáticos de alfafa proliferadas por um longo período indicando uma mudança no potencial embriogênico relacionada com a idade da cultura (CHUGH AND KHURANA, 2002).

Uma mudança no estado de metilação também é observada quando células embriogênicas de cenoura são tratadas com auxina exógena e aparentemente um nível ótimo

de metilação é necessário para o desenvolvimento normal dos embriões somáticos, pois níveis de metilação acima ou abaixo desse patamar podem bloquear irreversivelmente o processo embriogênico (CHUGH AND KHURANA, 2002).

#### 1.6.4.3. Genes induzidos por ABA

Thomas Bennet-Clark e colaboradores no início dos anos 50 trabalhavam com auxinas endógenas em extratos de plantas e separavam compostos ácidos por cromatografia em papel para testar sua habilidade em promover o crescimento de coleótilos. Seus experimentos detectaram uma substância que inibia o crescimento dos coleótilos, o que eles pensaram ser um complexo  $\beta$ -inibidor. Dois grupos de pesquisa trabalhando independentemente nos Estados Unidos da América (EUA) e no Reino Unido (RU), no início dos anos 60, isolaram respectivamente um composto de frutos de algodão que acelerava a abscisão (abscisin II) e um fator de folhas de sicômoro que induzia dormência (Dormina). Frederick Addicott e colaboradores trabalhando nos EUA relataram a estrutura da Abscina II que foi mais tarde chamada de ácido abscísico (ABA) o qual é idêntico a dormina.

Nos dias de hoje sabe-se que ABA é um hormônio vegetal que regula vários processos durante a embriogênese e formação da semente, e é sabido que ocorre a acumulação deste em várias partes da planta em resposta a estresses abióticos como seca, congelamento, e estresse salino. O nível endógeno de ABA apresenta um pico durante a maturação do embrião e um decréscimo para baixos níveis na semente desidratada. Os mecanismos pelos quais ABA regula a expressão gênica envolvem eventos transcricionais e pós-transcricionais, tais como processamento do transcrito, estabilidade do mRNA, controle da translação, atividade e degradação de proteínas (CHUGH AND KHURANA, 2002).

As proteínas LEA (late embryogenesis abundant) também são induzidas por ABA, e vários cDNAs que codificam para essas proteínas já foram isolados e caracterizados. *DcECP31*, *DcECP40*, *AtECP31*, *AtECP63* são genes de cenoura e *Arabidopsis* que codificam para proteínas LEA, os quais exibem um aumento na sua expressão em embriões somáticos no estágio de torpedo, mas não em plântulas, implicando sua regulação por ABA e outros fatores específicos do embrião (CHUGH AND KHURANA, 2002).

Comparação e análise funcional de vários genes que respondem ao ABA levou a identificação de elementos de resposta ao ABA (ABRE) em plantas. Esses elementos são seqüências de DNA que permitem a ligação de determinados fatores de transcrição que irão modular a expressão dos genes que os contém. Até o presente momento mais do que 20

ABREs funcionais foram identificados em promotores que respondem ao ABA com 8 a 10 pares de base de extensão e que possuem a seqüência central ACGT (CHUGH AND KHURANA, 2002). Essa seqüência central ACGT é encontrada em muitos outros genes regulados por condições ambientais, que não são necessariamente mediadas por ABA. A especificidade do sinal é então uma combinação das seqüências ACGT e outras seqüências reguladoras no promotor (CHUGH AND KHURANA, 2002). Os genes *ECP* (extracellular protein) expressos durante a embriogênese somática também possuem ABREs na região dos seus promotores os quais contem um motivo conservado (ACGT) e um *Sph* box (CATGCATG) que foi identificado como um motivo que medeia a ativação gênica do gene regulador *Cl* da antocianina do milho (CHUGH AND KHURANA, 2002).

#### 1.6.4.4. Vias de transdução de sinais associadas ao desenvolvimento do embrião

A percepção de um estímulo hormonal e/ou um mensageiro secundário como o cálcio pode disparar várias cascatas de transdução de sinal em embriões somáticos de maneira similar ao que ocorre em outros processos de desenvolvimento das plantas superiores. Várias quinases foram identificadas e seus significados foram descritos desde a transdução de sinal na membrana celular até o seu sítio de ação. Essas proteínas quinase muitas vezes sofrem autofosforilação para a sua ativação e estão envolvidas na regulação de outros sinais transduzíveis na via de transdução de sinais (CHUGH AND KHURANA, 2002).

##### 1.6.4.4.1. Transdução de sinal mediada por cálcio

O íon cálcio é um mensageiro secundário que além de atuar em muitos processos regulados por hormônios, também atua em vários processos fisiológicos e celulares em plantas superiores. Durante qualquer transdução de sinal mediada por cálcio há um aumento geral no cálcio citossólico seguido pela percepção dessas mudanças por proteínas que se ligam ao cálcio. Essas proteínas ao se ligarem ao cálcio sofrem mudanças conformacionais que vão levar a proteína ao seu estado ativo podendo assim interagir com miríade de proteínas regulatórias (CHUGH AND KHURANA, 2002).

A calmodulina (CaM) surgiu como uma notável proteína envolvida na mediação da sinalização de íons cálcio em plantas. CaM é codificada por uma família multigênica em várias espécies de plantas. Essa proteína é regulada pós-transcricionalmente tanto por sua

habilidade de se ligar ao cálcio quanto pela metilação específica do resíduo de lisina 115 (CHUGH AND KHURANA, 2002).

O cálcio é essencial para induzir morfogênese de células indiferenciadas em embriões somáticos em uma concentração ideal. Em concentrações acima desse patamar não foram observadas mudanças no potencial embriogênico das células indiferenciadas em cultura. Em baixas concentrações a embriogênese somática é inibida. Bloqueadores de canais de cálcio (verpamil e nifedipine) também exercem um efeito inibitório sobre a capacidade embriogênica. O ionóforo A23187, além de suprimir a formação do embrião somático também causa deformidades morfológicas em embriões no estágio globular. Tais observações sugerem a importância do cálcio exógeno e da manutenção de um gradiente de cálcio para o desenvolvimento normal do embrião (CHUGH AND KHURANA, 2002).

Análises do cálcio associado à membrana e da distribuição total de cálcio usando corantes fluorescentes revelaram mudanças na distribuição do cálcio durante a embriogênese sem alteração na concentração de cálcio associada à membrana. Conforme citado por Chugh and Khurana, o complexo ativo cálcio/calmodulina foi detectado em regiões meristemáticas de embriões no estágio de torpedo e cordiforme sugerindo uma regra regulatória da calmodulina ativada em regiões embrionárias. A expressão do mRNA da CaM aumenta durante o período de indução dos embriões somáticos e permanece constante depois disso.

Chugh and Khurana, 2002 também relataram um aumento nos níveis de transcritos da proteína *MsCal* que se liga ao cálcio depois de um tratamento com 2,4-D em embriões globulares e de proteínas quinases cálcio dependente/calmodulina independente (CDPKs) as quais são ativadas por ligação direta ao cálcio. Essas proteínas apresentam um padrão de expressão temporal sendo expressas durante o desenvolvimento embrionário, mas não nas plântulas indicando seu envolvimento no processo de diferenciação e desenvolvimento dos embriões. *MsCPK3*, uma proteína quinase semelhante à calmodulina é expressa durante as fases iniciais da embriogênese somática. Sua expressão é induzida por choque térmico sugerindo que esta proteína possa mediar a reprogramação celular ativada por estresse durante a embriogênese somática (CHUGH AND KHURANA, 2002).

#### 1.6.4.4.2. SERK (Somatic embryogenesis receptor kinase)

Entre os muitos clones de cDNAs isolados de suspensões celulares de cenoura em várias fases de crescimento um deles exhibe homologia com proteínas quinases receptoras de plantas e animais. Uma vez que sua expressão ocorre em culturas de embriões somáticos,

esses genes ficaram conhecidos como SERK (Somatic embryogenesis receptor kinases). A proteína codificada por esse cDNA contém um domínio N-Terminal com cinco repetições ricas em leucina (LRRs) agindo como uma região de ligação a proteína. Um domínio intracelular e o motivo LRR também contem sítios potenciais de N-Glicosilação. Uma característica única da proteína SERK é a presença de uma região rica em prolina entre o domínio LRR extracelular e a região que atravessa a membrana. Apesar de que um domínio transmembrana esteja presente no amino terminal da proteína, este não exibe características de peptídeo sinal. O domínio intracelular de SERK contém 11 subdomínios característicos do núcleo catalítico das proteínas quinase e a segunda metade do motivo C-terminal pode mediar a interação proteína-proteína, um pré-requisito para a transmissão de uma cascata intracelular de fosforilação (CHUGH AND KHURANA, 2002). Sequências LRRs do gene SERK apresentam homologia com o gene *ERECTA* de *Arabidopsis* o qual está envolvido na regulação do desenvolvimento de órgãos originados a partir do meristema apical realizando um papel importante na morfogênese de plantas (TORII et al., 1996). Análises de Southern revelaram que deve existir somente uma cópia do gene SERK. Desse modo, o gene SERK pode servir como um marcador molecular característico para diferenciar células competentes de células não-competentes para o processo de embriogênese somática.

Um marcador estrutural da embriogênese somática foi identificado em *Brassica napus*. Análises de microscopia eletrônica revelaram a presença de um complexo adicional chamado matriz extracelular (ECM) na parte mais externa de tecidos embriogênicos e que não foi encontrado em tecidos não embriogênicos. ECM aparece nos estágios iniciais da embriogênese e desaparece durante a fase de maturação (PARAMESWARI et al., 2006).

#### 1.6.4.5. Genes homeóticos

Os genes homeóticos ou homeobox são genes reguladores que controlam a formação de padrão e a diferenciação morfológica em organismos multicelulares. Esses genes contêm uma sequência conservada de nucleotídeos característica chamada sequência homeobox. Esse box ou homeodomínio codifica para um fator de transcrição associado ao o desenvolvimento tanto em animais como em plantas. Já foram identificados genes homeobox codificando para fatores de transcrição com motivo HTH (Helix-Turn-Helix), embora sejam mais característicos os motivos Zíper de Leucina. Os produtos destes genes foram detectados durante o desenvolvimento embriogênico em embriões nos estágios globular, coração,

torpedo e em tecidos vasculares, mas nunca em tecidos não embriogênicos (CHUGH AND KHURANA, 2002).

O isolamento de grupos de genes homeóticos e o estudo dos mecanismos regulatórios em que estes genes estão envolvidos levarão ao entendimento do processo de formação de padrão durante o desenvolvimento embriogênico.

#### 1.6.5. Considerações finais

A habilidade das culturas *in vitro* em gerar embriões está restrita a um grupo de células nas suspensões celulares ou uma zona discreta do calo embriogênico. No primeiro caso, a resposta diferencial entre os tipos celulares pode ser atribuída a diferenças no tempo de exposição aos reguladores de crescimento, e a duração desse tempo depende do estado fisiológico de cada célula. Outra explicação plausível pode ser o uso de diferentes reguladores de crescimento em cada experimento; cada regulador pode ativar diferentes etapas na embriogênese. Finalmente se diferentes genótipos forem utilizados, uma resposta diferente para o mesmo estímulo pode ser observada. Considerando o segundo caso, a presença de células não embriogênicas em um agregado celular embriogênico pode sugerir que estas células têm funções auxiliares no processo. Estas células agem estimulando as células competentes através de compostos secretados, provavelmente derivados da parede celular, que regulam a entrada na via de formação de embriões.

A análise ultraestrutural é o primeiro passo no estudo da morfogênese em plantas. Em ambos os sistemas de embriogênese somática, a reprogramação é necessária para a manifestação da capacidade embriogênica, entretanto na ESD as chances são menores que na ESI. O conhecimento da origem, unicelular ou multicelular, dos embriões somáticos é essencial para as aplicações biotecnológicas. Um sistema que origina embriões a partir de uma única célula é muito promissor para a aplicação da tecnologia de inserção de genes, pois evita a formação de quimeras. Um sistema embriogênico secundário (a fonte de material são embriões somáticos) pode ser útil quando os embriões têm uma origem multicelular.

Durante os últimos dez anos ocorreu um considerável aumento na quantidade de informação relacionada com os mecanismos moleculares da embriogênese somática. A identificação recente de genes que são marcadores da transição de célula somática para embriogênica como os receptores SERK e genes capazes de induzir o processo embriogênico abriram espaço para novas estratégias de pesquisa do processo. Apesar de a embriogênese somática ser uma ferramenta para o entendimento dos estágios iniciais da embriogênese

zigótica, as investigações com embriões mutantes levaram a identificação de passos chave para a indução de embriogênese somática. Contudo, apesar de várias pesquisas relativas a embriogênese somática, a falta de conhecimento sobre os fatores que controlam o fenômeno, comprova que existem ainda muitos pontos a serem entendidos sobre o processo. Apesar de poucos genes indutores do processo embriogênico terem sido identificados, a procura por genes como *SERK* (HECHT et al., 2001), *LEC* (LOTAN et al., 1998, STONE et al., 2001), *BABY BOOM* (BOUTILILIER et al., 2002), *WUSCHEL* (ZUO et al., 2002) e *PICKLE* (OGAS et al., 1999), é o maior campo de pesquisa nessa área atualmente. O uso de mutantes aumentará o nosso conhecimento acerca da expressão gênica durante a fase inicial da embriogênese.

Suspensões celulares de diferentes espécies secretam diversas moléculas no meio de cultura. O atual desafio é determinar quais destas moléculas desempenham papéis em processos fisiológicos. O mecanismo de secreção e as moléculas sinais envolvidas nisso, bem como a busca pelos receptores, alvos das moléculas secretadas e suas vias de trasdução de sinais deve ser o foco de trabalhos futuros. Das quitinases que são secretadas no meio de cultura, pelo menos uma delas é capaz de resgatar o fenótipo selvagem do mutante sensível a temperatura de cenoura, o que nos encoraja a levantar a hipótese de que o substrato para a quitina pode ser uma das moléculas secretadas ou pode estar presente na parede celular; as AGPs são candidatas ideais para ser esse substrato (VAN HENGEL et al., 2001, 2002).

Os mecanismos bioquímicos e moleculares que regulam a embriogênese somática permanecem longe de ser bem entendidos. Para que possamos compreender de forma clara o processo de embriogênese somática é necessário que sistemas de regeneração com alta frequência e com sincronia sejam desenvolvidos em outras espécies além da cenoura. A embriogênese somática pode nos ajudar a entender como as células vegetais usam as alavancas celulares que permitem que elas permaneçam totipotentes, enquanto mantêm a divisão celular, o crescimento e a organização sob controle.

Deve-se buscar nos próximos anos mutantes que têm seu desenvolvimento embriogênico paralisado durante os vários estágios da embriogênese, para se identificar os genes que têm uma função crítica durante tais estágios, sem o produto do qual o processo não pode continuar. Principalmente em estágios críticos como o que ocorre da transição globular - torpedo onde os principais eventos de determinação de padrão acontecem. Deve-se também buscar marcadores moleculares específicos de embriões que possam determinar estágios diferentes do desenvolvimento embrionário, permitindo assim uma separação melhor das massas e ajudando na sincronização do processo. A caracterização de genes que tem seu

padrão de expressão alterado durante a embriogênese pode revelar como se dá a regulação do processo e revelar importantes pontos para a compreensão do desenvolvimento embrionário. Também deve ser conduzida uma comparação de expressão gênica entre calos embriogênicos e não embriogênicos para identificar genes relacionados com o período de indução. A embriogênese em plantas está saindo desse modo de uma era descritiva e experimental para a era da biologia molecular.

A elucidação dos mistérios do processo de desenvolvimento em plantas combinada com as informações de bancos gênicos pode prover um entendimento mais abrangente da totipotência das células vegetais e ajudar a desenvolver um sistema de embriogênese somática aplicável a quase todas as espécies de plantas.

## **2. OBJETIVOS**

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Desenvolver protocolos de regeneração para o feijão-de-corda cv. Pitiúba via embriogênese somática.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Induzir a formação de calos embriogênicos;
- Isolar linhagens de calos embriogênicos friáveis;
- Estabelecer culturas de suspensão celular;
- Avaliar os parâmetros de crescimento das suspensões celulares;
- Caracterizar histologicamente as linhagens de calos;
- Induzir a histodiferenciação de embriões somáticos a partir da cultura de calos embriogênicos.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Material vegetal**

Nesse estudo foram utilizadas sementes (maduras e imaturas) de feijão-de-corda (Pitiúba) [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] obtidas a partir de plantas cultivadas em um campo experimental situado ao lado da casa de vegetação do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará (UFC). A cada dia no início da manhã as flores das plantas de feijão que estivessem abertas recebiam uma etiqueta marcando o dia da abertura da flor (antese). As vagens imaturas foram colhidas em intervalos diários após a antese e suas sementes foram isoladas e utilizadas imediatamente. As sementes maduras foram armazenadas em frascos de vidro e mantidas em geladeira até sua utilização.

#### **3.2. Assepsia dos explantes**

As sementes maduras e as vagens imaturas foram imersas em álcool 70% por 1 minuto e lavadas com água destilada autoclavada. Em seguida as sementes e as vagens foram tratadas em solução de hipoclorito de sódio 1% por 10 minutos para descontaminação superficial e então foram lavadas 5 vezes com água destilada autoclavada.

Após a descontaminação das sementes maduras, estas foram incubadas para germinar por 18 horas, a temperatura ambiente, em placas de Petri autoclavadas, entre dois papéis de filtro estéreis umedecidos com água destilada autoclavada.

Ápices caulinares, discos foliares e secções do hipocótilo foram obtidos de plântulas crescidas em frascos de vidro com algodão umedecido em água destilada autoclavada. Todos os procedimentos acima descritos foram conduzidos em câmara de fluxo laminar. Todo o material foi autoclavado a 121° C por 15 minutos.

#### **3.3. Meios de cultura utilizados**

Neste trabalho foram utilizados os seguintes meios para a indução de calos embriogênicos e suspensões celulares:

- Meio de indução de calos primários (GC 1,5; TABELA 1);
- Meio da suspensão celular (SC-1; TABELA 2);

- Meios de indução de calos utilizando diferentes auxinas sintéticas: (MI 1 - MI 15; TABELA 1);
- Meios dos experimentos de histodiferenciação: (MR1, MR2, MR3, MR4, MR5 GC 0,5; GC 0,1; GC 0,0; TABELA 2).

### **3.4. Preparo dos meios de cultura**

As soluções estoques de sais, vitaminas, reguladores de crescimento, sacarose, D-manitol e ágar foram adicionados ao meio antes da autoclavação. Os meios foram autoclavados por 15 minutos à 121°C. As culturas foram mantidas em sala de cultura sob fotoperíodo de 16 horas e à temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

### **3.5. Reagentes utilizados**

Os reagentes utilizados neste trabalho apresentam grau analítico. Os principais reagentes utilizados e os fabricantes estão listados na TABELA 3.

### **3.6. Indução de formação de calos a partir de explantes foliares, utilizando diferentes fito-reguladores sintéticos (2,4-D, Picloram e 2,4,5-T)**

Fragmentos foliares de  $0,5 \text{ cm}^2$  foram obtidos de folhas primárias de plântulas de feijão-de-corda 5 dias após a germinação. Os explantes foram inoculados em meios contendo 2,4-D, 2,4,5-T ou Picloram nas concentrações de 0,5; 1,5; 2,5; 6,25; 12,5 mg/L. Nove explantes foram cultivados por placa de Petri contendo 30 mL de meio de cultura com três repetições para cada tratamento. O material foi incubado em sala de cultura sob fotoperíodo de 16 h e temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . O material foi analisado 30 dias após a incubação.

### **3.7. Indução de calos utilizando diferentes explantes**

Vagens com 2, 4, 6 dias após a antese (DAA) foram coletadas no campo experimental para os experimentos de indução de calos. As vagens, livres de contaminantes, foram seccionadas e as sementes imaturas isoladas. As vagens imaturas foram dissecadas e as sementes foram então partidas em metades ou tiveram os eixos embrionários extraídos.

Sementes maduras assépticas foram embebidas em água por 18 h. Após esse período, suficiente para emergência da radícula, os eixos embrionários foram isolados dos cotilédones. Foram inoculados 5 eixos por placa.

Secções foliares de 0,5 cm<sup>2</sup> foram obtidos de folhas primárias de plântulas de feijão-de-corda 5 dias após a germinação tendo o cuidado de descartar a nervura central da folha. Estes foram usados como explante para o experimento de indução de calos. Foram inoculados 14 a 20 secções foliares por placas de meio com a face abaxial em contato com o meio de cultura.

Secções do hipocótilo de 0,5 mm foram isoladas de plântulas germinadas sob condições assépticas. 12 secções de hipocótilo foram inoculadas por placa de meio.

Ápices caulinares foram isolados de plântulas de feijão-de-corda cultivadas sob condições assépticas. 3 ápices caulinares foram inoculados por placa de meio.

Todos os explantes foram cultivados em placas de Petri contendo 30 mL de meio GC 1,5. Todo o material foi incubado em sala de cultura sob fotoperíodo de 16 H e temperatura de  $25 \pm 2$  °C. O material foi analisado 30 dias após a incubação. Todos os explantes foram seccionados e isolados com o auxílio de pinça e bisturi.

### **3.8. Estabelecimento e manutenção das linhagens de calos embriogênicos**

Após 3 semanas de cultivo em meio GC 1,5, os calos primários formados na superfície do explante disco foliar foram subcultivados em meio GC 0,5. Após 4 semanas diferentes tipos de calos foram observados na superfície dos calos primários. Esses tipos de calos foram então cuidadosamente selecionados com o auxílio de uma pinça e uma lupa em câmara de fluxo laminar. Os tipos de calos isolados foram então subcultivados em meio GC 0,5 fresco a cada 4 semanas. Todo o material foi incubado em sala de cultura sob fotoperíodo de 16 H e temperatura de  $25 \pm 2$  °C.

### **3.9. Análise histológica**

Calos das quatro diferentes linhagens foram coletados sob lupa em câmara de fluxo laminar e fixados em solução de gluteraldeído 1% e paraformaldeído 4% (KARNOVSKY, 1965) por quarenta e oito horas.

Passados 4 dias as amostras foram lavadas com tampão fosfato pH 6,8 e desidratadas em série etílica crescente (10 a 100%) por uma hora em cada passo. Nos dois últimos estágios

de desidratação (90 e 100%) as amostras foram colocadas em um dessecador equipado com uma bomba de vácuo por meia hora.

Após a desidratação, as amostras foram embebidas e emblocadas em historesina Leica. Posteriormente, secções de 5 µm foram obtidas em um micrótomo automático Leica RM 2065 montadas em lâmina e coradas com azul de toluidina 0,12% em boráx 5% e fucsina básica 0,05% (JUNQUEIRA, 1990). Para a montagem permanente das lâminas utilizou-se resina sintética entellan.

Os resultados foram registrados com uma câmera digital Sony P72 acoplada à ocular de um microscópio Jenalumar Carl Zeiss.

### **3.10. Experimentos de histodiferenciação**

Os calos da linhagem 2 foram subcultivados em meios MR1, MR2, MR3, MR4 E MR5. Dois calos foram inoculados por placa de meio de histodiferenciação. Todo o material foi incubado em sala de cultura sob fotoperíodo de 16 H e temperatura de  $25 \pm 2$  °C. O material foi analisado 30 dias após a incubação.

### **3.11. Efeito do pulso de 2,4-D sob a indução de calos embriogênicos no feijão-de-corda**

Secções foliares foram incubadas em meio GC 1,5. Após 2, 3, 4, 5 e 6 dias os explantes foram subcultivados em meios com quantidade reduzida de 2,4-D (GC 0,5, GC 0,15, GC 0). Nove secções foliares foram inoculadas por placa de Petri. Todo o material foi incubado em sala de cultura sob fotoperíodo de 16 horas. O material foi analisado 30 dias após a incubação.

### **3.12. Estabelecimento e manutenção das culturas de suspensão celular**

Depois de 15 a 20 dias os calos de crescimento da linhagem 2 cultivados em meio GC 0,5 foram usados para iniciar as suspensões celulares. Aproximadamente 0,3 mL (volume de células empacotadas-PCV) de calo foram selecionados, medidos em tubos corning e inoculados em erlenmeyrs de 125 mL contendo 20 mL de meio SC-1 composto de sais MS e vitaminas B5, suplementado com 3% de sacarose, 150 mg/L de hidrolisado de caseína, 100 mg/L de L-Glutamina, 0,5 mg/L de 2,4-D. Calos das quatro diferentes linhagens foram inoculados nas suspensões celulares.

Após 20 dias de cultivo a cultura foi transferida para o meio SC-2 composto de sais MS e vitaminas B5, suplementado com 3% de sacarose, 150 mg/L de hidrolisado de caseína, 100 mg/L de L-Glutamina, 0,25 mg/L de 2,4-D.

As suspensões foram subcultivadas a cada quatro dias. Estas foram mantidas em repouso por aproximadamente 15 minutos até que as células sedimentassem, e em seguida 10 mL do meio sobrenadante foram substituídos pela mesma quantidade de meio fresco.

### **3.13. Curva de crescimento das células embriogênicas em suspensão celular**

Calos da linhagem 2 foram utilizados para iniciar as suspensões celulares destinadas aos estudos dos parâmetros de crescimento. 0,3 mL de massa celular foram inoculados em erlenmeyrs contendo 20 mL do meio SC1 para o experimento do padrão de crescimento. As suspensões foram mantidas sem subcultivo.

Para os experimentos de aumento de massa fresca foram testados dois volumes de inóculo: 0,1 mL e 1,0 mL. A massa celular foi inoculada em frascos erlenmeyrs contendo 20 mL do meio SC1. As suspensões foram subcultivadas a cada quatro dias, 10 mL de meio era substituído por meio fresco.

As suspensões foram mantidas em uma mesa agitadora e mantidas em sala de cultura sob foto-período de 16 horas. A cada dia o volume celular foi medido em triplicatas usando tubos corning.



TABELA 2 - Composição dos meios de histodiferenciação e suspensão celular utilizados neste trabalho.

COMPONENTE	GC 0,5	GC 0,1	GC 0,0	MR1	MR2	MR3	MR4	MR5	SC-1
Sais	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Vitaminas	B5	B5	B5	B5	B5	B5	B5	B5	B5
Sacarose	3%	3%	3%	2%	2%	2%	2%	2%	3%
Hidrolisado de Caseína	150 mg/L	150 mg/L	150 mg/L	150 mg/L	150 mg/L	150 mg/L	150 mg/L	150 mg/L	150 mg/L
Glutamina	100 mg/L	100 mg/L	100 mg/L	100 mg/L	100 mg/L	100 mg/L	100 mg/L	100 mg/L	100 mg/L
Prolina	-	-	-	-	1 g/L	-	-	1 g/L	-
ANA	-	-	-	-	-	-	0,25 mg/L	0,25 mg/L	-
BA	-	-	-	-	-	2,0 mg/L	-	2,0 mg/L	-
2,4-D	0,5 mg/L	0,1 mg/L	-	0,25 mg/L	0,25 mg/L	-	-	-	0,5 mg/L
2,4,5-T	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Picloram	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fitigel	-	-	-	0,25 %	0,25 %	0,25 %	0,25 %	0,25 %	-
Ágar	0,7 %	0,7 %	0,7 %	-	-	-	-	-	-
pH	5,8	5,8	5,8	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,8

TABELA 3 - Reagentes utilizados e sua procedência.

Reagentes	Fabricante
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	Sigma Chem Co., St. Louis, MO, USA
Ácido Naftalênico Acético	Sigma Chem Co., St. Louis, MO, USA
Ácido 2,4,5-Triclorofenoxiacético	Sigma Chem Co., St. Louis, MO, USA
Ágar	Sigma Chem Co., St. Louis, MO, USA
Álcool Comercial	Álcool Santa Cruz LTDA, SP, BRA
Azul de Toluidina	Vetec Química Fina LTDA, RJ, BRA
Benzilaminopurina	Sigma Chem Co., St. Louis, MO, USA
Boráx	Sigma Chem Co., St. Louis, MO, USA
Entellan	Sigma Chem Co., St. Louis, MO, USA
Fitagel	Sigma Chem Co., St. Louis, MO, USA
Fucsina Básica	Vetec Química Fina LTDA, RJ, BRA
Gluteraldeído	Vetec Química Fina LTDA, RJ, BRA
Hidrolisado de Caseína	Sigma Chem Co., St. Louis, MO, USA
Hipoclorito de Sódio	Vetec Química Fina LTDA, RJ, BRA
Historesina	Leica Heidelberg, Alemanha
L- Glutamina	USB Co., Cleveland, OH, USA
Paraformaldeído	Vetec Química Fina LTDA, RJ, BRA
Picloram	Sigma Chem Co., St. Louis, MO, USA
Prolina	Sigma Chem Co., St. Louis, MO, USA
Sacarose	Sigma Chem Co., St. Louis, MO, USA
Sais B5	Sigma Chem Co., St. Louis, MO, USA
Sais MS	Sigma Chem Co., St. Louis, MO, USA

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Indução de formação de calos a partir de explantes foliares, utilizando diferentes fito-reguladores sintéticos (2,4-D, Picloram e 2,4,5-T)

Os explantes foliares cultivados nos meios de indução de calos deram origem à formação de calos em todos os tratamentos testados (FIGURA 1). Entre os fitoreguladores testados o 2,4-D parece ser o mais promissor na formação dos calos embriogênicos. Os calos obtidos nos meios com os reguladores Picloram e 2,4,5-T apresentaram calos friáveis de crescimento rápido. Os calos formados nos tratamentos com 2,4,5-T mostraram uma variedade de tipos de calos semelhante aos obtidos no meio com 2,4-D, mas a frequência de formação dos calos com características embriogênicas foi maior em meio suplementado com 2,4-D. Existem relatos na literatura de uso de 2,4,5-T na indução de calos em feijão de corda (MUTHUKUMAR et al., 1995), mas o calo formado é regenerado em plantas pela via organogênica através de transferência para meio suplementado com Benzilaminopurina (BA). Os calos formados com 2,4,5-T no nosso trabalho não parecem ser embriogênicos. As suspensões obtidas através do cultivo desses calos formaram aglomerados que se multiplicaram e depois oxidaram.

Esses três reguladores de crescimento são os mais utilizados nos protocolos de embriogênese somática, sendo que o 2,4-D é de longe o mais utilizado. Existem calos de plantas que respondem bem até mais de um desses reguladores como é o caso da ervilha (KYSLEY et al., 1987). A formação de embriões somáticos nessa espécie requer Picloram ou 2,4-D. Parrot, 1990 fez um estudo comparativo do efeito de uma auxina fraca (ANA) e 2,4-D sobre a formação de embriões somáticos em *Trifolium repens*. O regulador ANA não foi efetivo na produção de embriões somáticos em nenhuma das concentrações testadas. O 2,4-D foi eficaz na formação de embriões somáticos, porém os embriões formados apresentavam pequenas deformações nos cotilédones.

Apesar de o 2,4-D ser o regulador mais utilizado existem pesquisadores que preferem utilizar o 2,4,5-T quando não há diferença na regeneração induzida por esse dois reguladores de crescimento. Segundo Venkov et al., 2000 embora 2,4-D e 2,4,5-T sejam compostos muito semelhantes, as culturas estimuladas por 2,4,5-T apresentam pouca variação somaclonal

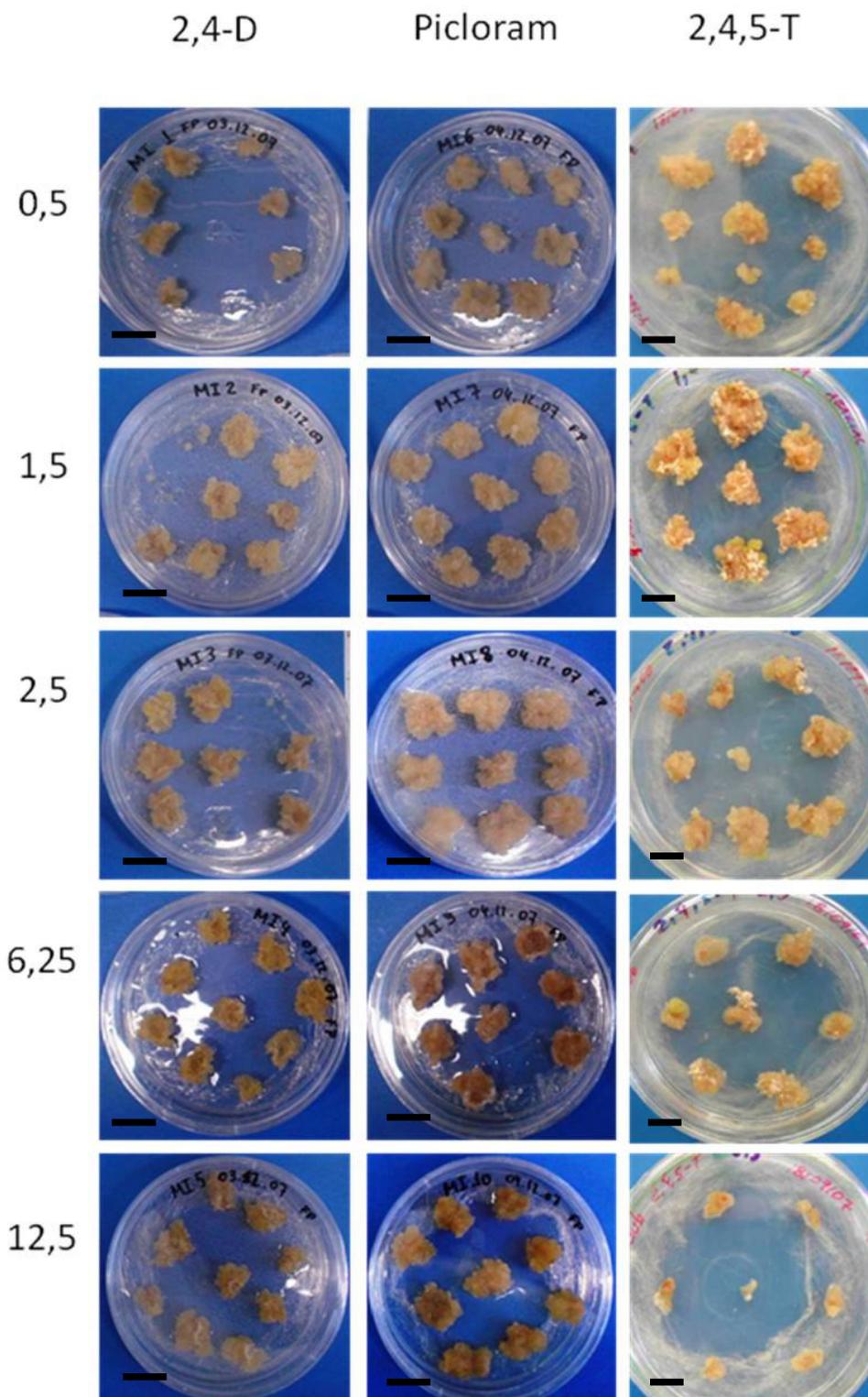


FIGURA 1 - Indução de calos utilizando 2,4-D (Coluna da esquerda), Picloram (Coluna do meio) e 2,4,5-T (Coluna da direita). As fotos foram feitas aos 45 dias de cultivo. Barra = 1 cm.

devido a menor frequência de mutagênese induzida por esse composto quando comparado ao 2,4-D.

No caso das plantas leguminosas o meio MS suplementado com 2,4-D foi efetivo na indução de embriogênese somática em *Cajanus cajan* (ANBAZHAGAN & GANAPATHI, 1999), *Vigna radiata* (DEVI et al., 2004), *Medicago sativa* (MONTEIRO et al., 2003) e *Arachis hypogaea* (LITTLE et al., 2000).

Os nossos experimentos mostraram que a formação de calos ocorre em meio suplementado com qualquer um dos três reguladores de crescimento utilizados e que o 2,4-D na concentração de 1,5 mg/L é o meio de escolha pela presença de setores possivelmente embriogênicos encontrados através do cultivo de discos foliares nesse meio. Esses setores ao serem cultivados em meio líquido originavam MPEs. Além desses motivos, outro fator que motiva a escolha do 2,4-D como agente indutor da formação de calos embriogênicos em feijão-de-corda é o fato de este regulador ser largamente utilizado para indução de embriogênese somática em leguminosas incluindo o feijão-de-corda (RAMAKRISHNAN et al., 2005a).

#### **4.2. Indução de calos embriogênicos utilizando diferentes tipos de explantes**

O processo de formação dos calos embriogênicos foi influenciado pelo tipo de explante utilizado e pelo tempo de exposição ao 2,4-D.

Entre os explantes utilizados, eixos de embriões (6 D.A.A.), eixos de embriões maduros, fragmentos foliares, secções do hipocótilo e ápices caulinares apresentaram boa formação de calos em quase todos os explantes quando cultivados em meio GC 1,5. Dos explantes embriões imaturos, as metades de sementes (2 DAA), não deram origem a formação de calos e apenas 10% dos explantes (4 DAA) deram origem a calos. Essa pequena frequência de formação de calos nos embriões imaturos pode ser devido a um requerimento nutricional diferenciado para esses explantes. Deve ser conduzida uma mudança nas concentrações de sais do meio, pois as concentrações no meio MS basal podem ser muito altas para cultivar tecidos imaturos. O meio basal de Pellegrineschi et al., 1997 parece ser uma alternativa adequada para a solução desse problema.

Considerando os explantes que apresentaram boa frequência de formação de calos, os fragmentos foliares foram os explantes que deram origem a calos de melhor qualidade e por isso foram usados como explante para estabelecer linhagens de calos embriogênicos. Outro motivo em escolher fragmentos de folhas primárias é o número de protocolos que utilizam

esse explante como fornecedor de calos embriogênicos tanto em leguminosas (LAKSHMANAN E TAJI, 2000) quanto em outras espécies de plantas como o café (TEIXEIRA et al., 2004), o melão (THIRUVENGADAM et al., 2006) e a Jojoba (Hamama et al., 2001). Fragmentos foliares também apresentam facilidade de isolamento e custo e tempo reduzido de obtenção do explante se comparada ao trabalho que leva para marcar as flores e coletar as vagens em desenvolvimento e isolar os embriões e ápices caulinares. Além disso, diferentes sistemas de regeneração via embriogênese somática tem usado folhas jovens como explante de escolha. Em café, Teixeira et al., 2004 relataram uma maior frequência de formação de embriões somáticos utilizando como explante inicial folhas jovens. No sistema do café a embriogênese pode ocorrer pelas vias, direta ou indireta, e em ambas as vias o explante utilizado são as folhas jovens.

A maioria dos protocolos de embriogênese somática no feijão-de-corda obteve sucesso na indução de embriogênese somática a partir de folhas em desenvolvimento (KULOTHUNGAN et al., 1995, ANAND et al., 2000 e RAMAKRISHNAN et al., 2005a). Devi et al., 2004 em experimentos com embriogênese somática em *Vigna radiata*, também conseguiram os melhores resultados usando folhas primárias em comparação com cotilédones, hipocótilos e nós. Essas informações combinadas levam a crer que o explante folha jovem deve ser utilizado nos experimentos que envolvam a regeneração do feijão-de-corda e por isso foi explante escolhido para os experimentos deste trabalho.

#### **4.3. Formação dos calos primários, isolamento e caracterização das linhagens de calos embriogênicos**

A incubação de folhas primárias de feijão-de-corda em meio suplementado com 1,5 mg/L de 2,4-D levou a rápida proliferação das células localizadas ao redor do feixe vascular (JEREISSATI, 2006). As células da bainha do feixe vascular já mostraram serem responsáveis pela formação das massas pró-embriogênicas em algumas espécies de plantas. Menéndez-Yuffá & García de García, 1997 em café mostraram que as massas pró-embriogênicas eram originadas de células da bainha do feixe vascular. A proliferação celular já pôde ser observada após três dias de cultivo e após 5 dias resultou na formação de massas homogêneas compostas de células pequenas, isodiamétricas com citoplasma denso. A proliferação das massas levou a formação de calos friáveis que se proliferaram rapidamente cobrindo toda a extensão do explante.

TABELA 4 - Explantes utilizados nos experimentos de indução de calos embriogênicos.

<b>ORIGEM DO EXPLANTE</b>	<b>EXPLANTE</b>		
<b>Embriões Imaturos</b>	Eixos embrionários (6 DAA)	Embriões (4 DAA)	Metades de sementes (2 DAA)
<b>Embriões Maduros</b>	Eixos embrionários		
<b>Plântulas</b>	Ápice caulinar	Discos foliares	Secções do Hipocótilo

Após trinta dias de cultivo pode ser observada a proliferação de diferentes linhagens de calos sobre os calos primários. Os calos obtidos foram periodicamente isolados e subcultivados a cada 30 dias. Os calos que apresentaram diferenças de friabilidade, coloração, crescimento foram cuidadosamente isolados. Após 60 dias, foram isoladas 4 linhagens de calos que mantiveram suas características durante os subcultivos (FIGURA 2). A linhagem 1 consiste de um calo altamente friável de cor verde e de crescimento rápido. A coloração verde dos calos desta linhagem é um indicativo da presença de clorofila nessas células, o que é incompatível com características de células embriogênicas. A linhagem 2 consiste de um calo amarelo, com textura mucilaginosa, pouco friável e de crescimento lento, A linhagem 3 consiste de um calo marrom, friável, de crescimento rápido e que oxida facilmente. A linhagem 4 consiste de um calo amarelado, friável com crescimento rápido (TABELA 5).

Essas linhagens foram subcultivadas por mais de um ano e os calos mantiveram suas características durante todo o período. Delbreil et al., 1994 isolaram uma linhagem de calos embriogênicos em *Asparagus officinalis* que pôde ser subcultivada mensalmente por muitos anos sem perder a capacidade embriogênica. Além disso, esses calos foram subcultivados em meio desprovido de reguladores de crescimento, sugerindo que estes apresentam um nível endógeno adequado de auxinas e citocininas (SMITH & KRIKORIAN, 1989) ou modificações na sensibilidade a esses fatores de crescimento. As análises histológicas mostraram que a epiderme dos embriões somáticos tem uma estrutura desorganizada semelhante ao que se vê nas massas pró-embriogênicas de feijão-de-corda. Talvez essa desorganização seja um indício de embriogênese somática recorrente.

O estabelecimento de linhagens de calos que se mantém embriogênicos por longos períodos já foi descrita em outras espécies de plantas como na espécie modelo, *Daucus carota* (SMITH & KRIKORIAN, 1989). Os embriões somáticos são originados a partir de pequenas células isodiamétricas com características meristemáticas, i.e.: células que apresentam pequenos vacúolos, núcleo volumoso e nucléolo evidente. Essas características citológicas são consistentes com observações anteriores sobre a embriogênese somática em outras espécies, segundo Haccius, 1978.

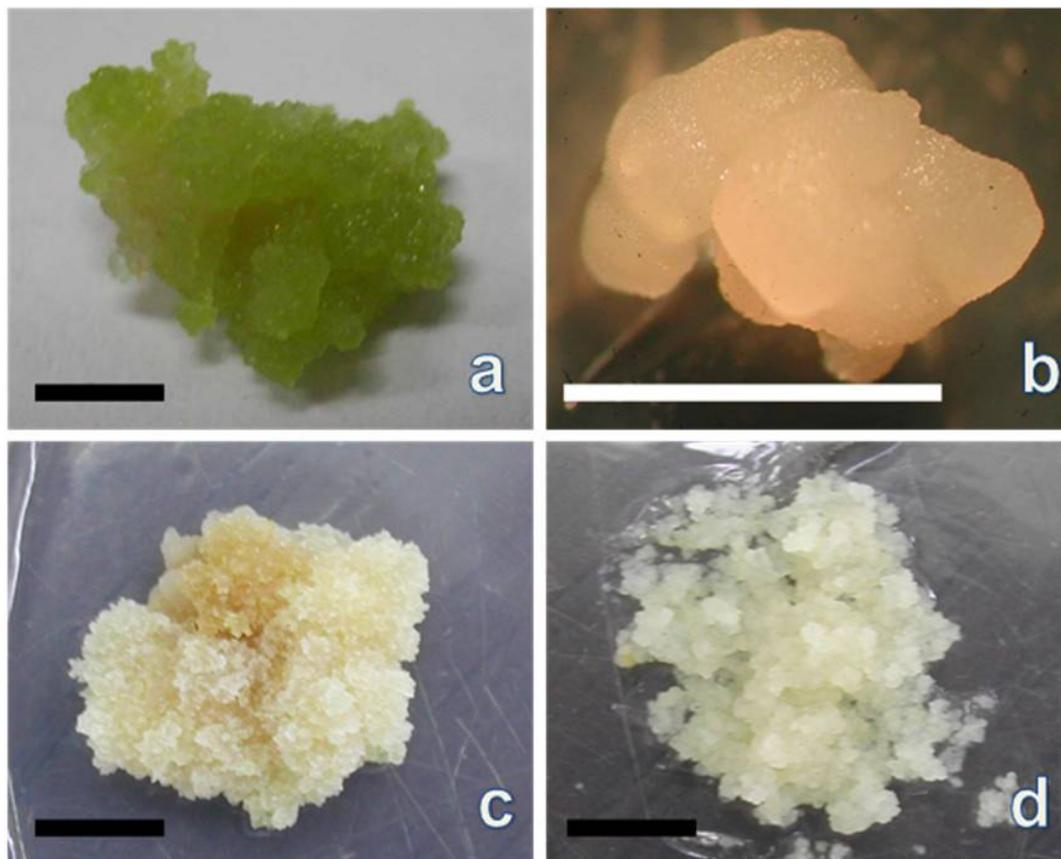


FIGURA 2 - Linhagens de calos isolados a partir de calos primários formados pelo cultivo dos explantes foliares em meio GC 1,5. As fotos foram feitas aos 7 meses de cultivo. A: Calo Verde Friável, Linhagem 1, B: Calo Gelatinoso Linhagem 2, C: Calo Marrom Friável, Linhagem 3, D: Calo Amarelo Friável, Linhagem 4. Barra = 0,5 cm.

TABELA 5 - Características das Linhagens de calos de feijão-de-corda.

Linhagens de calos	Características dos calos		
	Coloração	Crescimento	Friabilidade
1	Verde	++++	Friável
2	Amarelo	+	Mucilaginoso, Pouco Friável
3	Marrom	++	Pouco Friável
4	Branco	++++	Friável

#### 4.4. Análise histológica das diferentes linhagens de calos embriogênicos

As quatro linhagens de calos apresentaram células com morfologia distinta em todos os tipos de calos. O calo da linhagem 1 (FIGURA 3) apresenta alta friabilidade e é composto principalmente de células de citoplasma denso, formato arredondado, nucléolo evidente com a presença de vários vacúolos pequenos. Essas células não têm a tendência de formar agregados multicelulares como nas massas pró-embriogênicas. Também pode ser observada a presença de células alongadas vacuoladas e células pequenas arredondadas vacuoladas. Essas células alongadas não apresentam citoplasma denso, um indicativo de alta taxa metabólica, possuem grandes vacúolos estando dessa forma em certo grau de diferenciação não compatível com características células de embriogênicas. Essa linhagem apresenta uma alta taxa de divisão celular que pode ser notada pelo rápido crescimento do calo em cultura.

Os calos da linhagem 2 apresentam uma natureza agregada, apresentando-se organizados em massas. Pode ser observada uma grande quantidade de massas composta de células com características embriogênicas, que apresentam citoplasma denso, nucléolo evidente, pequenos vacúolos, tamanho pequeno e formato isodiamétrico (FIGURA 4). Também foi observada a presença de células pequenas ovais vacuoladas, células arredondadas vacuoladas e algumas células alongadas. Essas células ovais, arredondadas e alongadas não apresentam características de células embriogênicas.

Os calos da linhagem 3 é o único tipo de calo que não apresenta células com características embriogênicas em sua composição (FIGURA 5). As células desse tipo de calo apresentam tamanho e forma variados. Foi observada a presença de células alongadas vacuoladas, células grandes arredondadas vacuoladas, células pequenas arredondas com citoplasma de baixa densidade e grandes vacúolos e células vacuoladas de formato irregular com alguns pontos de sua superfície abaulada. Também foi observada a presença de células plasmolizadas em processo de morte celular nesse tipo de calo.

Os calos da linhagem 4 de natureza friável apresentam alguns agrupamentos de células com características de células embriogênicas em sua composição (FIGURA 6). Essas células têm o citoplasma denso, núcleo evidente, vacúolos pequenos. Foi observada também a presença de células de citoplasma denso de com um vacúolo grande. Porém a grande maioria deste tecido é composta de células não embriogênicas de formatos arredondados vacuoladas e alongados vacuoladas com núcleo de baixa densidade. Também foi observada a presença de células plasmolizadas e de formato irregular nesse tipo de calo.

A presença de células pequenas e arredondadas com características de células embriogênicas não é o único fator que deve ser levado em consideração para afirmar que determinada linhagem de calo é embriogênica ou potencialmente embriogênica. Toonen et al., 1994, mostraram que cinco tipos celulares distintos apresentavam capacidade de formar embriões somáticos em cultura. Esses tipos celulares incluíam células alongadas. Portanto outros tipos de teste devem ser conduzidos no intuito de identificar o tipo de calo apropriado.

A observação histológica combinada com os testes de suspensão celular ao qual esses calos foram submetidos indicam que a linhagem de calo 2 apesar de não ser a mais friável é a que apresenta maior potencial para formar embriões somáticos em cultura. Os próximos trabalhos de embriogênese somática em feijão-de-corda deverão trabalhar com essa linhagem de calo facilmente isolável e altamente estável em cultura.

Alguns autores mostraram a presença de células meristemáticas com as mesmas características encontradas nesse trabalho (FERNANDO et al., 2001, 2002; MENÉNDEZ-YUFFÁ e GARCÍA DE GARCÍA, 1997). Loiseau et al., 1998 relataram a presença de amido nessas células embriogênicas e Puigderrajols et al., 2001 mostraram a presença de proteínas e de corpos lipídicos em células embriogênicas. Todos estes compostos de reserva são necessários para a proliferação celular e o amido é requerido principalmente para o desenvolvimento do embrião. Testes histoquímicos devem ser conduzidos para verificar a presença de reservas nessas células embriogênicas de feijão-de-corda.

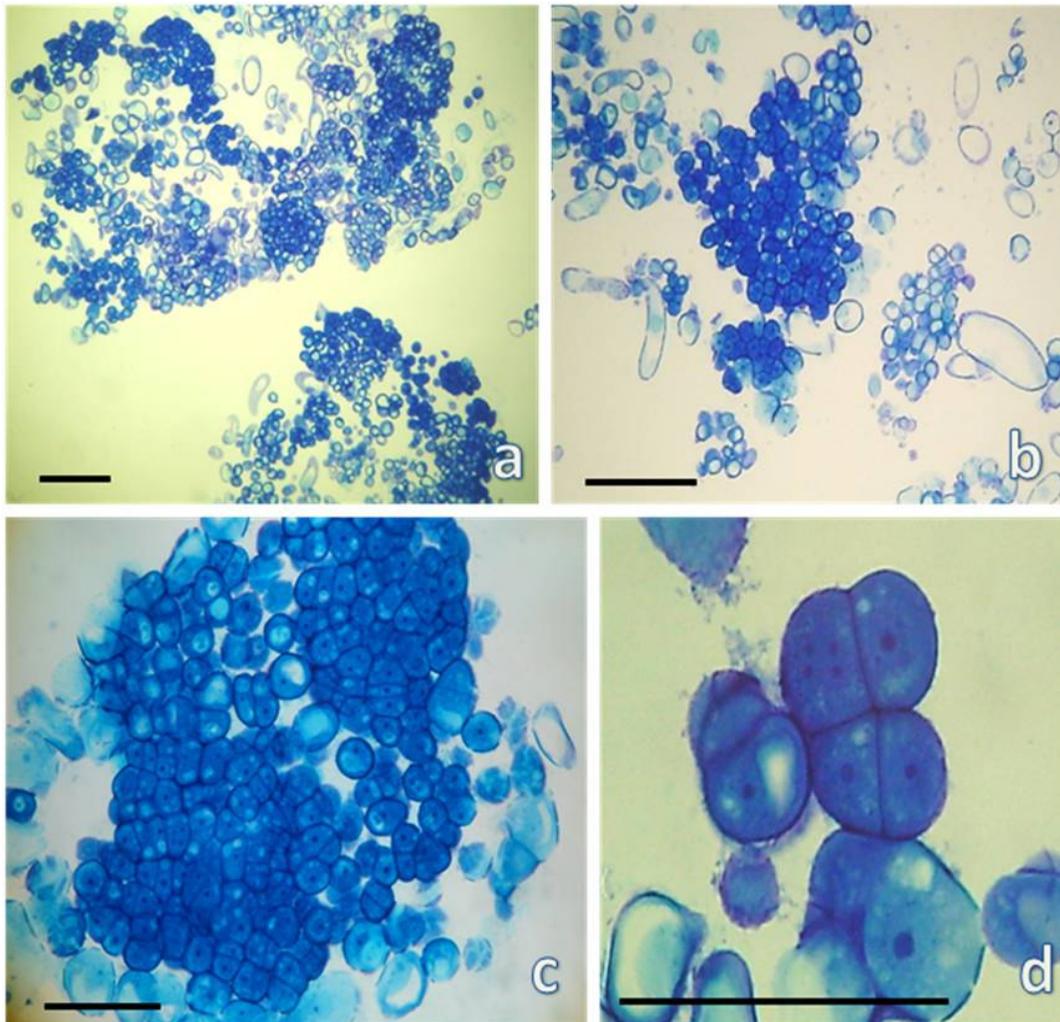


FIGURA 3 - Análise histológica de calos da linhagem 1. A e B: aspecto geral do calo 1 mostrando a característica friável dessa linhagem da calo. C: Destaque das células de citoplasma denso no calo 1. D: Detalhe das células em c mostrando células em divisão. Barra: A e B = 100  $\mu$ m, C e D = 50  $\mu$ m.

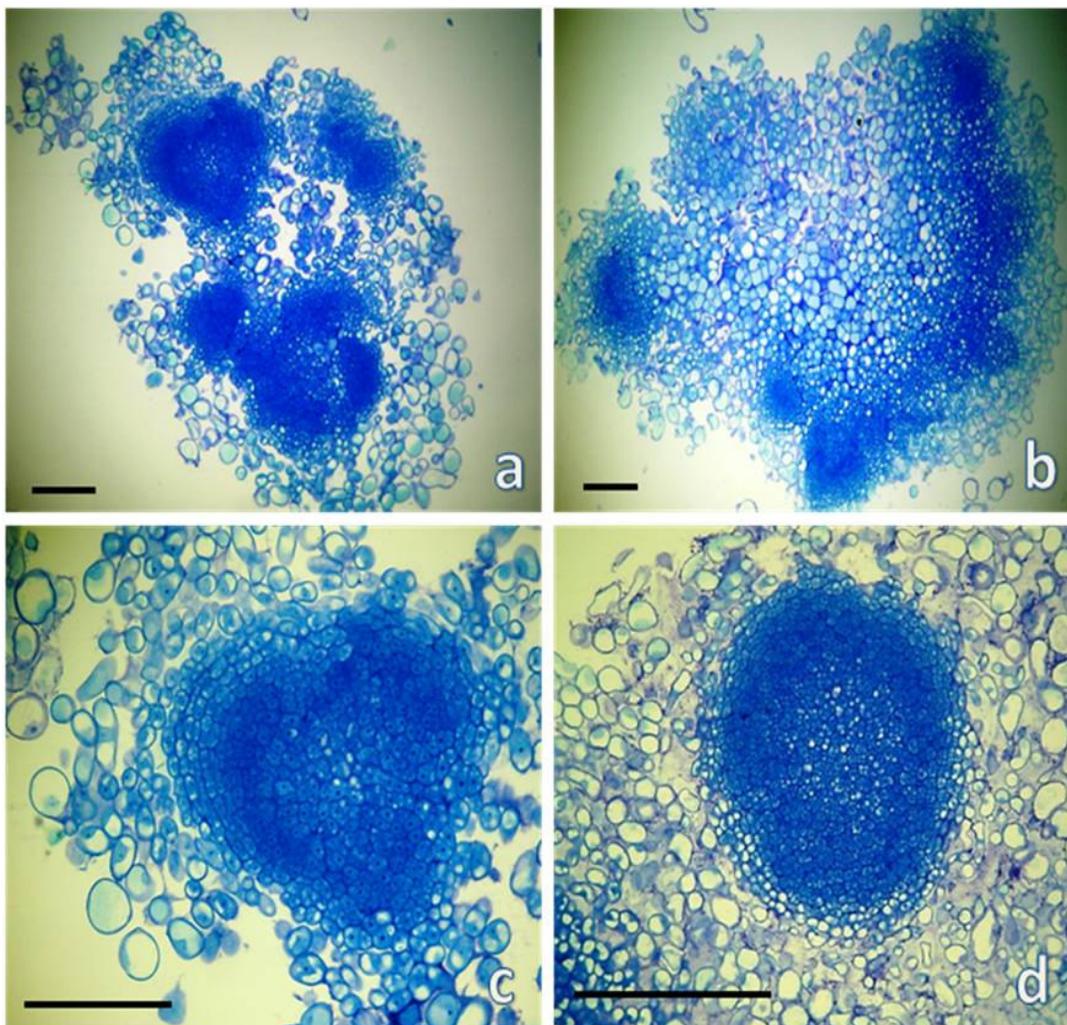


FIGURA 4 - Análise histológica de calos da linhagem 2. A e B: Aspecto do calo 2 mostrando sua natureza aglomerada e a presença de muitos agrupamentos de células embriogênicas. C e D: Detalhe dos aglomerados de células embriogênicas. Barras = 100  $\mu\text{m}$ .

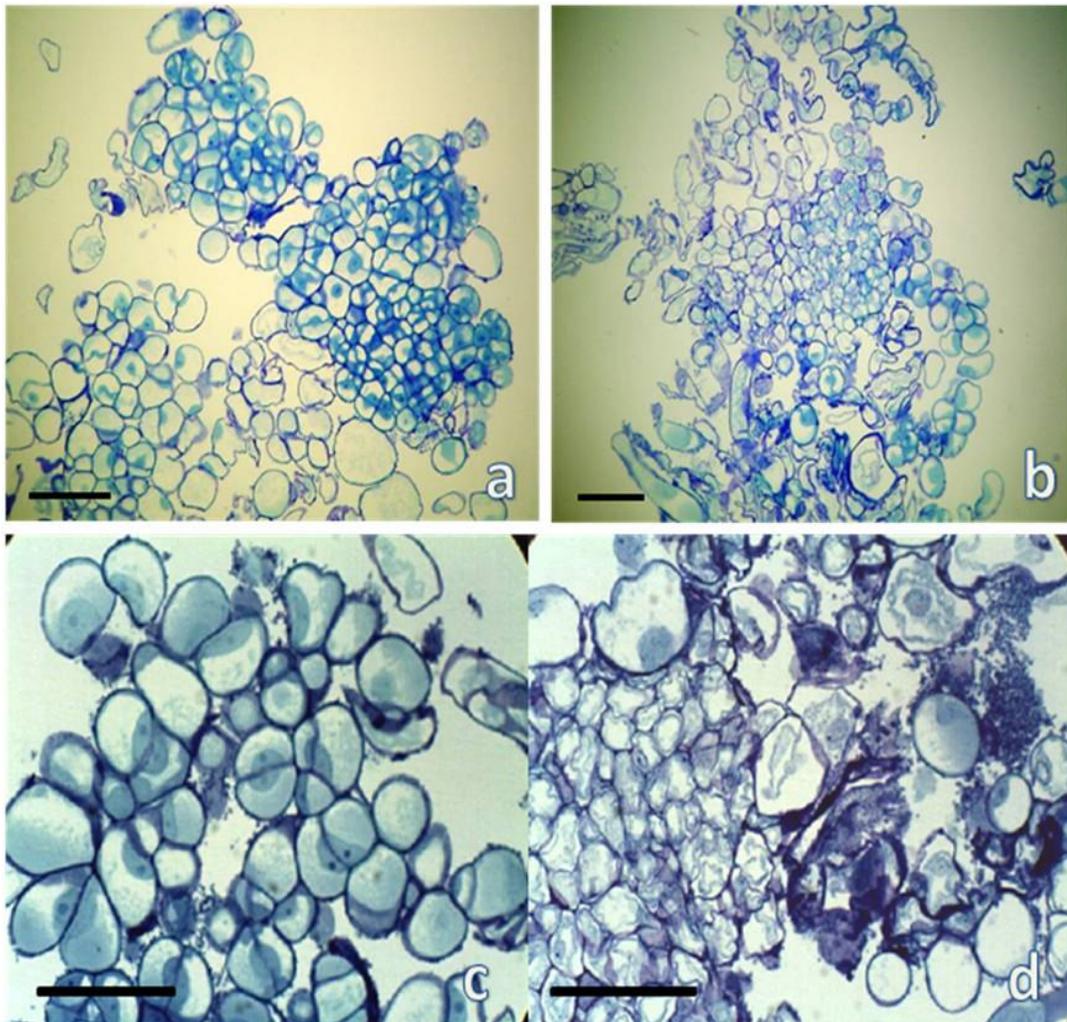


FIGURA 5 - Análise histológica de calos da linhagem de calos 3. A e B: Aspecto do calo mostrando a ausência de células embriogênicas e a presença de células mortas. C: Detalhe das células vivas do calo 3, D: Detalhe da degradação celular que ocorre no calo. Barras: 100  $\mu$ m.

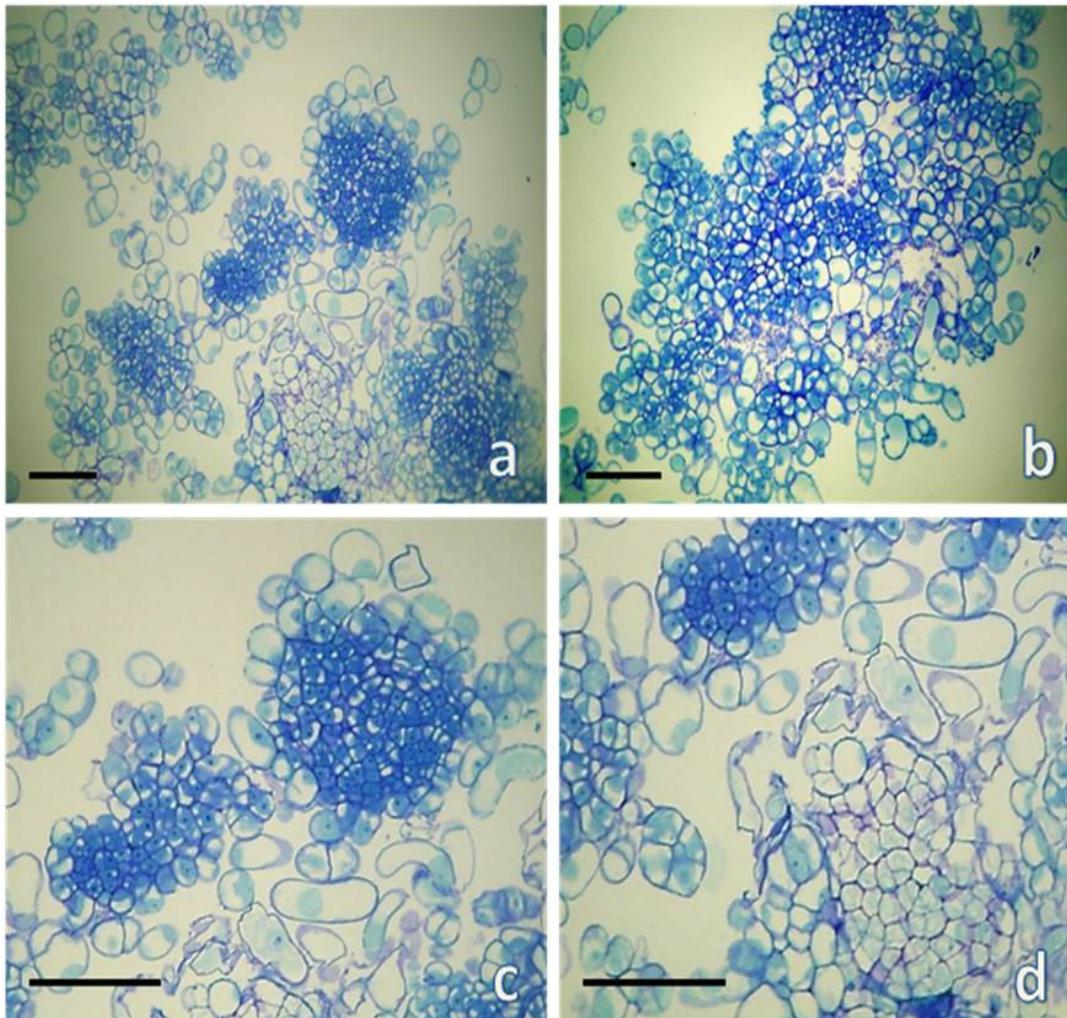


FIGURA 6 - Análise histológica de calos da linhagem 4. A e B: Aspecto geral do calo mostrando uma composição celular variada com a presença de algumas células embriogênicas. C e D: Detalhe dos aglomerados celulares. Barras: 100  $\mu\text{m}$ .

#### 4.5. Estabelecimento e manutenção das suspensões celulares

A transferência dos tipos calos obtidos em meio sólido para meio líquido levou ao estabelecimento das suspensões celulares em duas semanas. Dos calos das 4 diferentes linhagens que foram inoculados em meio SC-1, apenas os calos da linhagem 2 deram origem a formação de estruturas potencialmente embriogênicas em cultura líquida. Os calos das linhagens 1 e 3 oxidaram rapidamente em cultura. O calo da linhagem 4 formou muitos aglomerados celulares arredondados porém de tamanho grande e superfície rugosa que apresentavam tendência ao aglomeramento formando grandes agrupamentos celulares que em nada lembram as estruturas compostas de massas pró-embriogênicas obtidas com o cultivo da linhagem 2.

Após 15 a 20 dias de cultivo as suspensões celulares no meio SC-1, apresentavam pequena proliferação celular e agregados celulares arredondados de cor amarelo opaco e de tamanho pequeno.

Os agregados celulares foram transferidos para a suspensão celular com meio de cultura de mesma composição do anterior, porém com uma concentração de 2,4-D reduzida e foi observada a formação de algumas estruturas de formas muito semelhantes a embriões somáticos nos estágios: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar. A diminuição da concentração ou retirada do 2,4-D do meio de cultura é uma estratégia muito usada na indução de embriões somáticos.

Suspensões celulares são altamente estáveis. Halperin et al., 1966 mostraram que suspensões celulares de cenoura podem ser subcultivadas por até dois anos sem perder a competência embriogênica. Suspensões celulares consistem de células e agregados celulares dispersos em meios líquidos em agitação. O crescimento celular baseia-se nas mudanças das taxas de divisão em fases definidas. Inicialmente as células dividem-se lentamente (fase lag), posteriormente ocorrem fases de rápido crescimento (exponencial e linear) e por fim, as células entram em uma fase de diminuição nas taxas de divisão celular, a fase estacionária. Nesse momento o sistema de suspensão tende a estacionar e a retirada de uma amostra destas células deve ser feita. O subcultivo desta amostra de células em um meio fresco é uma maneira de renovar a cultura fazendo com que estas sejam propagadas de maneira quase que ininterrupta.

Suspensões celulares podem ser iniciadas pela inoculação de calos friáveis ou outros tecidos que possam originar linhagens de células organogênicas ou embriogênicas. Uma suspensão celular contém uma mistura de células vivas, mortas e resíduos celulares. A

filtragem seletiva com o uso de peneiras com poros de tamanho das células que se deseja trabalhar ajuda a homogeneizar a cultura.

A indução ou ativação de linhagens de células embriogênicas através de suspensões em meios líquidos pode propiciar um aumento na frequência de conversão das células embriogênicas em embriões somáticos, além de ser um sistema mais adaptado às tecnologias de encapsulamento para geração de sementes sintéticas.

#### **4.6. Curva de crescimento das células embriogênicas em suspensão celular**

O gráfico gerado pelos dados obtidos pelas médias dos PCV (Volume de Células Empacotadas), registrado diariamente geraram uma curva de crescimento típica. Os dados indicam que ocorre uma transição da fase lag para a fase exponencial em torno de 5 e 6 dias após a inoculação dos calos da linhagem 2 em meio líquido SC-1 (FIGURA 7). Os subcultivos devem então ser realizados dentro deste período de tempo. A curva gerada pelo programa Curve Expert 1.3, mostrou um alto índice de correlação entre os pontos ( $r = 0,99546255$ ). O incremento de peso fresco em função do volume do inóculo também foi avaliado. Foram utilizados dois volumes de inóculo: um menor (0,1 mL) e outro bem maior com 1,0 mL. Esse experimento foi conduzido no intuito de avaliar a concentração ideal de inóculo para iniciar as suspensões.

As curvas obtidas nesses experimentos indicam que um volume pequeno de inóculo é melhor quando se deseja ter uma produtividade mais rápida. Em 20 dias de cultivo o volume de células na suspensão do inóculo menor (0,1 mL) aumentou 14 vezes enquanto que o de inóculo maior aumentou 8 vezes (FIGURAS 8 e 9). Além disso as suspensões iniciadas com volume de inóculo 1,0 mL apresentou maior frequência de oxidação. Ben Amar et al., 2007 trabalhando com calos de videira verificou que inóculos iniciais muito volumosos podem prejudicar o estabelecimento de culturas de suspensão celular levando a uma rápida oxidação e um conseqüente decréscimo na taxa de crescimento. O reconhecimento de um volume de inóculo ideal pode melhorar a taxa de crescimento levando a uma proliferação vigorosa.

Com base no exposto acima podemos afirmar que o tempo ideal para subcultivo das suspensões celulares potencialmente embriogênicas de feijão-de-corda está dentro do período de 5 a 6 dias e que o volume ideal de inóculo deve ser pequeno estando dentro da faixa de 0,1 a 0,3 mL.

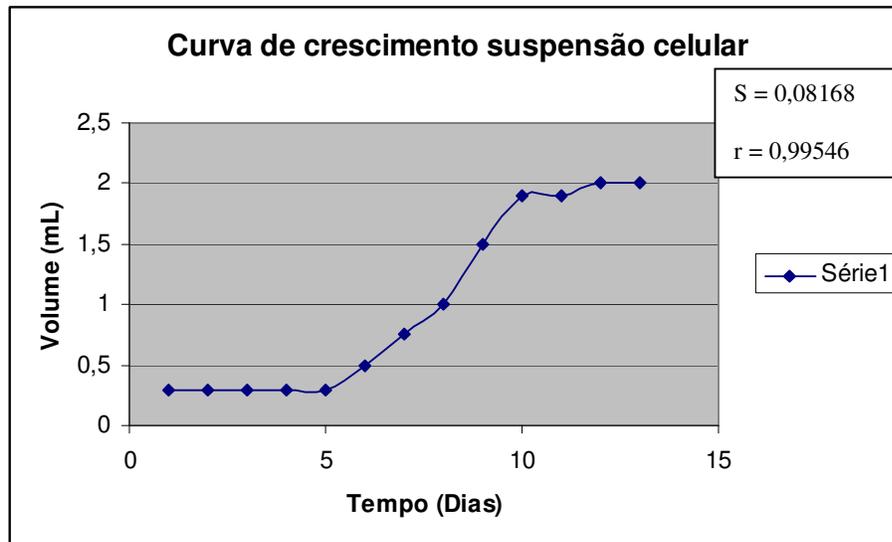


FIGURA 7 - Curva de crescimento da suspensão celular embriogênica. O eixo X corresponde ao tempo de em dias e o eixo Y corresponde ao volume de células empacotadas (PCV). Curva celular típica, o tempo para subcultivo ideal parece estar entre 5 e 6 dias.

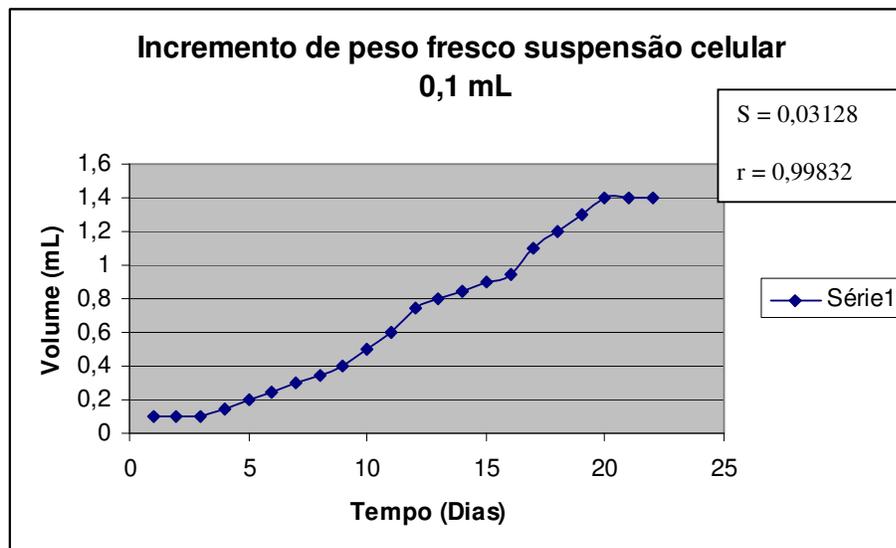


FIGURA 8 - Curva de incremento de massa fresca da suspensão celular embriogênica em função do volume do inóculo. O eixo X corresponde ao tempo de em dias e o eixo Y corresponde ao volume de células empacotadas (PCV). Inóculo = 0,1 mL.

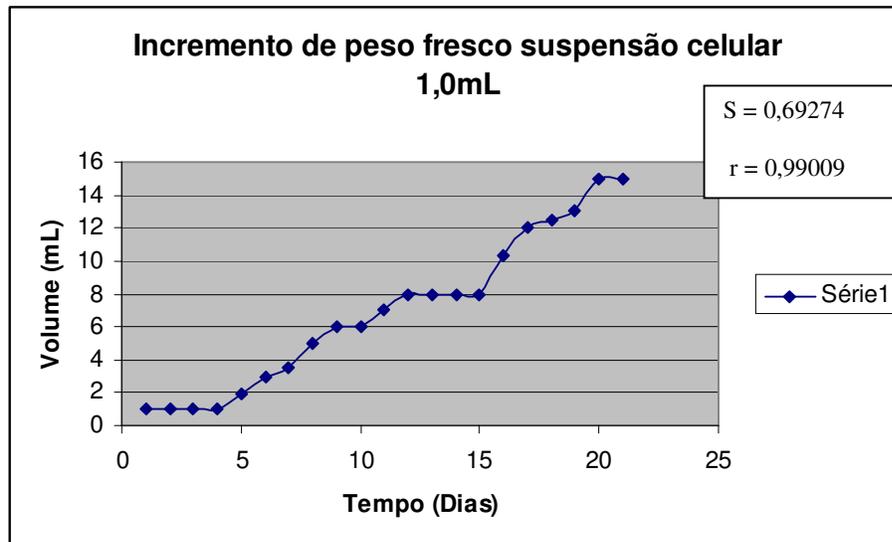


FIGURA 9 - Curva de incremento de massa fresca da suspensão celular embriogênica em função do volume do inóculo. O eixo X corresponde ao tempo de em dias e o eixo Y corresponde ao volume de células empacotadas (PCV). Inóculo = 1,0 mL.

#### 4.7. Experimentos de histodiferenciação

Os calos da linhagem 2, obtidos neste trabalho foram submetidos a diferentes meios de cultura para tentar induzir a histodiferenciação desses calos. Calos obtidos no meio GC 1,5 foram transferidos para os meios MR1, MR2, MR3, MR4, MR5. Nesses meios foram testados uma concentração seis vezes menor de 2,4-D (MR1), combinações de 0,25 mg/L 2,4-D e 1g/L de Prolina (MR2), 2 mg/ L de BA (MR3), BA combinado com ANA (MR4) e BA combinado com ANA e Prolina (MR5). A Prolina não teve um efeito diferencial sobre a histodiferenciação dos calos, pois não se observa diferenças entre os calos formados nos meios MR1 e MR2 e nos meios MR4 e MR5 (FIGURA 10). A redução da concentração de auxina e o cultivo em meio com citocinina também não foram efetivos na promoção da histodiferenciação dos calos da linhagem 2. Após 30 dias de cultivo os calos cultivados em meios MR1 e MR2 tiveram um crescimento acentuado, mantiveram a coloração amarela e apresentaram setores friáveis. Os calos transferidos para os meios MR3, MR4 e MR5 apresentaram crescimento rápido e se tornaram duros e compactos com alguns setores esverdeados.

O iminoácido prolina já foi relacionado com a estimulação da formação de calos embriogênicos (BELA & SHETTY, 1999) e já foi observado que a embriogênese somática está associada com um aumento no nível endógeno de prolina (THORPE, 1993 apud THIRUVENGADAM et al., 2006). Meio de cultura suplementado com prolina pode estimular a produção de embriões somáticos em *Medicago sativa* (SHETTY & MC KERSIE, 1993) e *Vigna radiata* (GIRIJA et al., 2000). Em contraste com o exposto acima, neste trabalho não foi relatado um efeito promotor da prolina na concentração de 1 g/L sobre a histodiferenciação dos calos de feijão-de-corda no sentido de estimular a produção de embriões somáticos. No entanto o uso deste iminoácido em experimentos de histodiferenciação de calos de feijão-de-corda não deve ser descartado já que seu efeito foi testado em apenas uma concentração.

##### 4.7.1 Efeito do pulso de 2,4-D sobre a histodiferenciação de calos em feijão-de-corda

Discos foliares foram inoculados em meio GC 1,5 e após 2, 3, 4, 5 e 6 dias foram transferidos para meios com menor concentração de 2,4-D (GC 0,5, GC 0,15, GC 0). O objetivo desse experimento foi verificar se o tempo de incubação dos explantes no meio de

indução influencia na histodiferenciação dos calos embriogênicos de feijão-de-corda. Uma vez que as massas pró-embriogênicas já estão formadas entre três e cinco dias em meio de indução (JEREISSATI, 2006) a escolha dos tempos foi adequada. Nesse tempo inicial é que ocorrem as principais mudanças. Uma vez que o fenômeno da embriogênese somática for disparado nas células competentes não é necessário nenhum estímulo adicional para a formação dos embriões, então ao reduzir o tempo em contato com o agente disparador (2,4-D) podemos aperfeiçoar o processo e ao mesmo tempo evitar os efeitos maléficos provocados pelo excesso de exposição a esse composto sintético.

Anormalidades em embriões somáticos são frequentemente encontradas na literatura e geralmente relacionadas com a contínua exposição dos embriões ao 2,4-D (FERNANDO et al., 2001, 2002). A exposição contínua à auxina sintética pode inibir a resposta morfogênética dos explantes (SLESACK et al., 2005) e por isso deve ser considerada quando os experimentos são planejados. Parrot, 1990 tentou reduzir o efeito maléfico do 2,4-D sobre a morfologia dos embriões somáticos de *Trifolium repens*. Foram utilizados diferentes tempos de exposição e diferentes concentrações de 2,4-D, porém nenhum dos tratamentos teve efeito significativo.

As respostas morfogênicas em plantas variam de acordo com as espécies, bem como suas variedades, limitando a extensão das respostas obtidas com uma variedade ou espécie à outras. O que se observou neste experimento foi que o pulso de auxina não teve efeito sobre a histodiferenciação dos calos em embriões somáticos de feijão-de-corda, porém uma mudança brusca nas condições de cultivo pode estimular a histodiferenciação destes calos em raízes. (TABELA 6). A explicação para formação de raízes nesses explantes está no fato de que as auxinas além de serem efetivos na indução de embriogênese somática também são os fitorreguladores com maior efetividade na promoção de enraizamento, podendo ser utilizada isoladamente ou combinadas no processo de indução de raízes, em concentrações variadas conforme a espécie (SORACE et al., 2007).

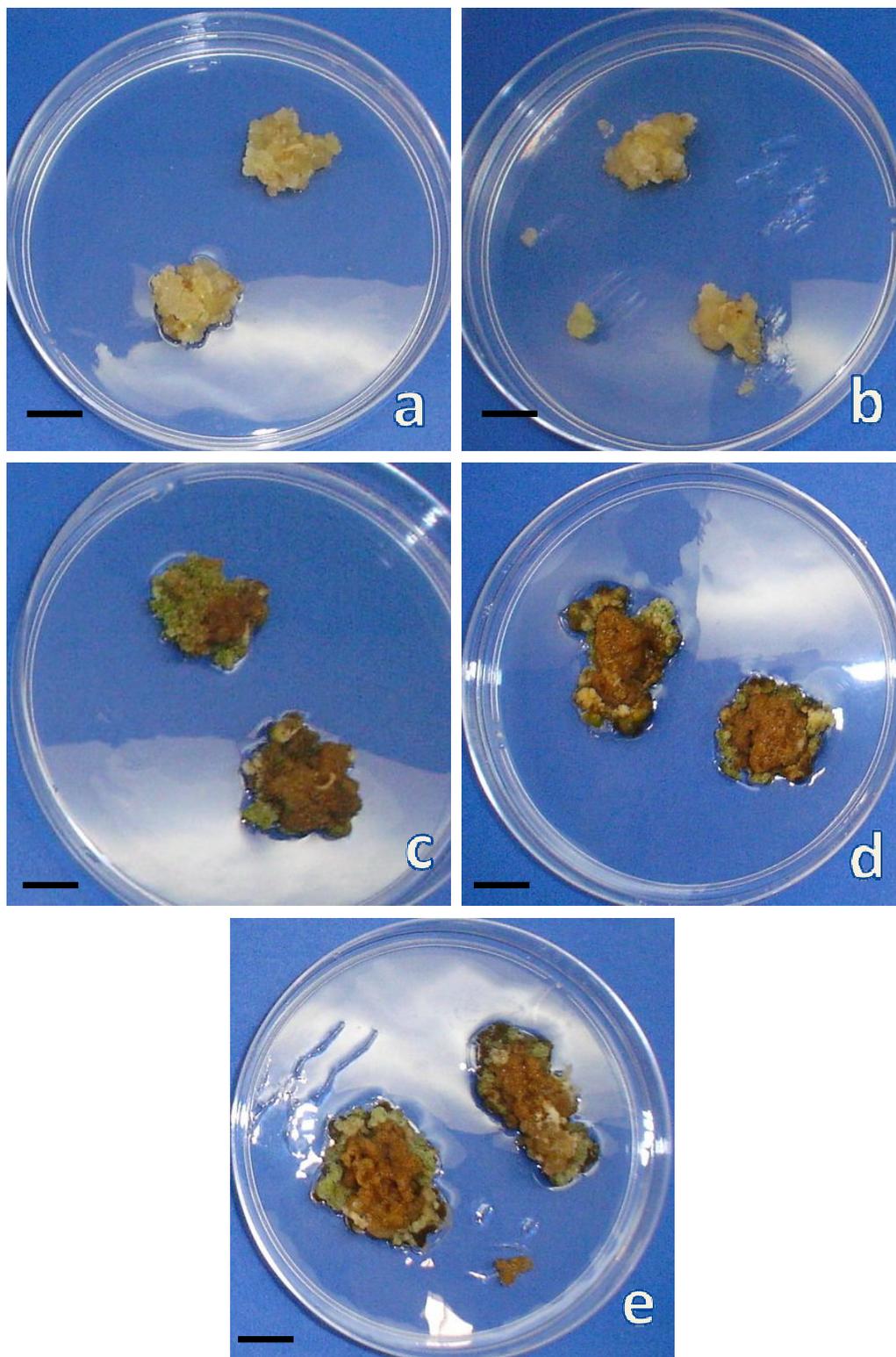


FIGURA 10 - Aspecto dos calos da Linhagem 2 cultivados nos meios de histodiferenciação após 30 dias. A: MR1, B: MR2, C: MR3, D: MR4, E: MR5. Barra = 1 cm.

TABELA 6 - Resposta dos explantes foliares ao pulso de auxina sintética 2,4-D. Os explantes retirados do meio de indução de calos primários exibiram resposta de formação de calo ou de raízes, não foi relatada a formação de embriões somáticos em nenhum dos tratamentos.

Meios de Cultura	Dias de exposição				
	2	3	4	5	6
GC 0,5	Raízes/Calos	Calos	Calos	Calos	Calos
GC 0,15	Raízes	Raízes	Raízes/Calos	Raízes/Calos	Calos
GC 0,0	Raízes	Raízes	Raízes	Raízes	Raízes/ Calos

## **5. CONCLUSÕES**

## 5. CONCLUSÕES

A formação de calos variou de explante para explante e o que apresentou maior formação de setores embriogênicos foi o explante folha jovem. Diferentes linhagens de calos foram isoladas e subcultivadas mensalmente. As análises histológicas mostraram que a linhagem 2 apresenta maior potencial embriogênico do que as outras. Os setores de calo da linhagem 2 foram cultivados em suspensão celular e ocorreu a formação de massas pró-embriogênicas nessas suspensões. As MPEs não foram observadas em suspensões das outras linhagens de calos. O calo potencialmente embriogênico (linhagem 2) apresenta uma coloração amarelada, crescimento lento, textura mucilaginosa e baixa friabilidade. Os experimentos de crescimento das suspensões celulares levaram a conclusão que volumes de inóculo entre 0,1 e 0,3 mL (PCV) e o tempo ideal para subcultivo está em torno de 5 dias. A suplementação com o iminoácido prolina na concentração de 1g/L nos meios de histodiferenciação não teve efeito positivo sobre a formação de embriões somáticos a partir de calos. Os pulsos de auxina também não foram efetivos na formação de embriões somáticos a partir da cultura de discos foliares. A linhagem 2 apesar de ser potencialmente embriogênica com base nas suas características morfológicas e anatômicas não produziu embriões somáticos em meio sem auxina, talvez pela pouca capacidade embriogênica do genótipo. Por esse motivo estudos devem ser conduzidos utilizando uma ampla variedade de genótipos especialmente os selvagens e os menos melhorados. A metodologia descrita aqui deve ser utilizada para o isolamento de calos embriogênicos em feijão-de-corda como base para trabalhos que envolvam regeneração via embriogênese somática nessa espécie.

## **6. PERSPECTIVAS FUTURAS**

## 6. PERSPECTIVAS FUTURAS

A regeneração de plantas via embriogênese somática é uma ferramenta muito útil para a aplicação de tecnologias de transformação genética. Apesar dos esforços desempenhados até hoje, a embriogênese somática em feijão-de-corda está longe de ser trivial. A maioria dos protocolos que conseguiram a regeneração dessa espécie foi conduzida na Índia com cultivares indianos. Aqui no Brasil esses protocolos têm sido adaptados às variedades mais utilizadas, porém sem muito sucesso. Os protocolos de embriogênese somática em feijão-de-corda utilizam o meio MS e auxina 2,4-D em concentrações de 0,5 a 1,5 mg/L como indutores do processo.

A adição do aminoácido Glutamina e de Hidrolisado de Caseína tem efeito positivo sobre a frequência de regeneração. Outros indutores do processo de embriogênese somática, como a utilização de meios condicionados, metais pesados, choque térmico entre outros, ainda não foram testados para essa espécie ou pelo menos não se tem relatos na literatura sobre esse tipo de abordagem e por isso merecem ser testados.

Os estudos que aumentem o entendimento do processo embriogênico em feijão-de-corda podem acelerar o desenvolvimento de protocolos aplicáveis a uma grande variedade de genótipos. Zale et al., 2004 compararam o comportamento de um conjunto variado de genótipos de trigo em suas respostas a uma determinada condição de cultivo *in vitro*. Foram detectadas diferenças significativas na frequência de regeneração de plantas entre os genótipos.

O calo da linhagem 2 mostrou ser potencialmente embriogênico, porém os experimentos conduzidos com o objetivo de estimular a histodiferenciação nesses calos falharam. A ausência de regeneração no cultivar Pitfuba pode ser devido ao efeito do genótipo. Há muito se sabe que diferentes genótipos dentro de uma mesma espécie podem responder de maneira completamente diferente ao mesmo tratamento hormonal. Essa resposta genótipo dependente pode ser devido ao nível endógeno de fito-hormônios. A obtenção de um protocolo de regeneração genótipo-independente para essa espécie está longe de ser obtida e é uma tarefa que demandará ainda muitos esforços. Deve ser utilizado cultivares de constituição genética mais variada possível, inclusive as variedades mais selvagens.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU EFM (2004) Estudos comparativos entre a embriogênese zigótica e somática no feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). 69 f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas)-**Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, Ceará.

ANAND RP, GANAPATHI A, ANBAZHAGAN VR, VENGADESAN G, SELVARAJ N (2000) High frequency plant regeneration via somatic embryogenesis in cell suspension cultures of cowpea, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant** 36: 475-480

ANBAZHAGAN VR & GANAPATHI A (1999) Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of pigeonpea (*Cajanus cajan*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 56: 179-184

ARAÚJO JPP org. (1988) O Caupi no Brasil. **IITA/EMBRAPA**. 722p.

BELA J, SHETTY K (1999) Somatic embryogenesis in anise (*Pimpinella anisum*): The effect of praline on embryogenic callus formation and ABA on advanced embryo development. **Journal of Food Biochemistry** 23: 17-32

BEN AMAR A, COBANOV P, BOONROD K, KRCZAL G, BOUZID S, GHORBEL A, REUSTLE GM (2007) Efficient procedure for grapevine embryogenic suspension establishment and plant regeneration: role of conditioned medium for cell proliferation. **Plant Cell Reports** 26(9): 1439-1447.

BOUTILIER K, OFFRINGA R, SHARMA VK, KIEFT H, OUELLET T, ZHANG L, HATTORI J, LIU C-M, VAN LAMMEREN AAM, MIKI BLA, CUSTERS JBM, VAN LOOKEREN CAMPAGNE MM (2002) Ectopic Expression of BABY BOOM Triggers a Conversion from Vegetative to Embryonic Growth. **The Plant Cell** 14: 1737-1749

BRAND U, FLETCHER JC, HOBE M, MEYERROWITZ EM, SIMON (2000) Dependence of Stem Cell Fate in *Arabidopsis* on a Feedback Loop Regulated by *CLV3* Activity. **Science** 289: 617

CARDOSO MJ (2000) A cultura do feijão caupi no Meio-Norte do Brasil. **Embrapa Meio-Norte. Circular Técnica**, 28. Teresina, 264p.

CLARK, SE (2001) Cell signalling at the shoot meristem. **Nature Reviews of Molecular Cell Biology** 2, 276-284

CHAPMAN A, BLERVACQ AS, VASSEUR J, HILBERT JL (2000) Arabinogalactan-proteins in Cichorium somatic embryogenesis: effect of beta-glucosyl Yariv reagent and epitope localization during embryo development. **Planta** 211: 305-314

CHARRIÈRE F, SOTTA B, MIGINIAC É & HAHNE G (1999) Induction of adventitious or somatic embryos on *in vitro* cultured zygotic embryos of *Helianthus annuus*: Variation of endogenous hormone levels. **Plant Physiology and Biochemistry** 37: 751-757

CHOI YE, KIM HS, SOHWY & YANG DC (1997) Developmental and structural aspects of somatic embryos formed on medium containing 2,3,5-triiodobenzoic acid. **Plant Cell Reports** 16: 738-744

CHOI YE, YANG DC, PARK JC, SOH WY, CHOI KT (1998) Regenerative ability of somatic single and multiple embryos from cotyledons of Korean ginseng on hormone-free medium. **Plant Cell Reports** 17: 544-551

CHUGH A AND KHURANA P (2002) Gene expression during somatic embryogenesis-recent advances. **Current Science** 83: 715-730

DANSO KE, FORD-LLOYD BV (2004) Cryopreservation of embryogenic calli of cassava using sucrose cryoprotection and air desiccation. **Plant Cell Reports** 22: 623-631

DE JONG AJ, CORDEWENER J, LO SHIAVO F, TERZI M, VANDEKERCKHOVE J, VAN KAMMEN A & DE VRIES SC (1992) A *Daucus carota* somatic embryo mutant is rescued by chitinase. **Plant Cell** 4: 425-433

DELBREIL B, GOEBEL-TOURAND I, LEFRANÇOIS C, JULLIEN M (1994) Isolation and Characterization of Long-term Embryogenic Lines in *Asparagus officinalis* L. **Journal of Plant Physiology** 144: 194-200

DEVI P, RADHA P, SITAMAHALAKSHMI L, SYAMALA D, MANOJ KUMAR S (2004) Plant regeneration via somatic embryogenesis in mung bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]. **Scientia Horticulturae** 99: 1-8

DODEMAN VL, DUCREUX G & KREIS M (1997) Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. **Journal of Experimental Botany** 48: 1493-1509

EHLERS JD, HALL EA (1997) Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) **Field Crops Research** 53:187-204

FAURE O, AARROUF J, NOUGAREDE A (1996) Ontogenesis, differentiation and precocious germination in anther-derived somatic embryos of grapevine (*Vitis vinifera* L.): Proembryogenesis. **Annals of Botany** 78:23-28

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

FEHÉR A, PASTERNAK T, DUDITS D (2002) Activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived alfalfa cells: the role of auxin and stress. **Acta Biologica Szegediensis** 46(3-4): 13-14

FERNANDEZ S, MICHAUX-FERRIÈRE N, COUMANS M (1999) The embryogenic response of immature embryo cultures of durum wheat (*Triticum durum* Desf.): histology and improvement by AgNO<sub>3</sub>. **Plant Growth Regulation** 28:147-155

FERNANDO JA, MELO M, SOARES MKM, APPEZZATO-DA-GLÓRIA B (2001) Anatomy of Somatic Embryogenesis in *Carica papaya* L. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 44(3): 247-255

FERNANDO JA, VIEIRA MLC, GERALDI IO, APPEZZATO-DA-GLÓRIA B (2002) Anatomical study of somatic embryogenesis in *Glycine max* (L.) Merril. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 45(3): 277-286

FILONOVA L, BOZHKOVA P & VON ARNOLD S (2000) Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. **Journal of Experimental Botany** 51: 249-264

GAMBORG OL, MILLER RA, OJIMA K (1968) Nutrient Requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research** 50: 151-158

GIRIJA S, GANPATHI A, ANANTHAKRISHNAN G (2000) Somatic embryogenesis in *Vigna radiata* (L.) Wilczek. **Indian Journal of Experimental Biology** 38: 1241-1244

GOLDBERG RB, PAIVA G, YADEGARI R (1994) Plant Embryogenesis: Zygote to Seed. **Science** 266: 605-614

GONÇALVES (2004) Estudos sobre a embriogênese somática no feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). 100 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - **Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, Ceará.

GREENBERG JT (1996). Programmed cell death: A way of life for plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 93(22): 12094-12097

GROSSMANN K (2000) Mode of action of auxinic herbicides: a new ending to a long, drawn out story. **Trends Plant Science** 5: 506-508

HALPERIN W (1966) Alternative morphogenetic events in cell suspensions. **American Journal of Botany** 53(5): 443-453

HAMAMA L, BAAZIZ M, LETOUZÉ R (2001) Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissues of jojoba. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 65: 109-113

HECHT V, VIELLE-CALZADA JP, HARTOG MV, SCHMIDT EDL, BOUTILIER K, GROSSNIKLAUS U, DE VRIES SC (2001) The Arabidopsis *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1* Gene Is Expressed in Developing Ovules and Embryos and Enhances Embryogenic Competence in Culture. **Plant Physiology** 127: 803-816

HIRT H (2000) Connecting oxidative stress, auxin, and cell cycle regulation through a plant mitogen-activated protein kinase pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 97: 2405-2407

IBARAKI Y & KURATA K (2001) Automation of somatic embryo production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 65: 179-199

JEREISSATI ES (2006) Análise histológica dos estágios iniciais da embriogênese somática no feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. 43 f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas)-**Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, Ceará.

JIMENEZ VM & BANGERTH F (2001a) Endogenous hormone concentrations and embryogenic callus development in wheat. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 67: 37-46

JIMENEZ VM & BANGERTH F (2001b) Hormonal status of maize initial explants and of the embryogenic and non-embryogenic callus cultures derived from them as related to morphogenesis *in vitro*. **Plant Science** 160: 247-257

JIMÉNEZ VM (2001) Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 13(2): 196-223

JUNQUEIRA CU (1990) O uso de cortes finos de tecidos na medicina e biologia. **Meios e métodos** 66: 10-11

KANGFU Y AND PAULS KP (2004) Identification of a RAPD marker associated with somatic embryogenesis in alfalfa. **Plant Molecular Biology** 22: 269-277

KARNOVSKY MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology** 27: 137-138

KOMAMINE A, MATSUMOTO M, TSUKAHARA M, FUJIWARA A, KAWAHARA R, ITO M, SMITH J, NOMURA K, FUJIMURA T (1990). Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry and molecular biology. In: NIJKAMP HJJ, VAN DER PLAS LHW, VAN AARTRIJK J (eds.) Progress in plant cellular and molecular biology. Dordrecht: **Kluwer Academic Publishers** 307-313

KRIKORIAN AD, SIMOLA LK (1999) Totipotency, somatic embryogenesis, and Harry Waris (1893–1973). **Physiologia Plantarum** 105: 348-355

KULOTHUNGAN S, GANAPATHI A, SHAJAHAN A, KATHIRAVAN K (1995) Somatic embryogenesis in cell suspension culture of cowpea (*Vigna unguiculata* (L) Walp). **Israel Journal of Plant Science** 43: 385-390

KYSELY W, MYERS JR, LAZZERI PA, COLLINS GB, JACOBSEN H (1987) Plant regeneration via somatic embryogenesis in pea (*Pisum sativum* L.). **Plant Cell Reports** 6(4): 305-308

LAKSHMANAN P, TAJI A (2000) Somatic embryogenesis in leguminous plants. **Plant Biology** 2: 136-148

LAUX T, MAYER KFX, BERGER J, JÜRGENS G (1996) The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. **Development** 122: 87-96

LI XB, XU ZH, WEI ZM (1995) Plant regeneration from protoplasts of immature *Vigna sinensis* cotyledons via somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports** (1995) 15: 282-286

LI Z & THOMAS TL (1998) *PEI1*, an embryo-specific finger protein gene required for heart-stage embryo formation in *Arabidopsis*. **The Plant Cell** 10: 383-398

LIN X, HWANG GJ & ZIMMERMAN JL (1996) Isolation and characterization of a diverse set of genes from carrot somatic embryos. **Plant Physiology** 112: 1365-1374

LITTLE EL, MAGBANUA, ZV, PARROTT WA (2000) A protocol for repetitive somatic embryogenesis from mature peanut epicotyls. **Plant Cell Reports** 19: 351-357

LIU C, XU Z, CHUA N (1993) Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. **The Plant Cell** 5: 621-630

LONG J, WOODY S, POETHIG S, BARTON MK (2002) Transformation of shoots into roots in *Arabidopsis* embryos mutant at the *TOPLESS* locus. **Development** 129: 2297-2306

LOISEAU J, MICHAUX-FERRIÈRE N, LE DEUNFF Y (1998) Histology of somatic embryogenesis in pea. **Plant Physiology and Biochemistry** 36(9): 683-687

LOTAN T, OHTO M, YEE KM, WEST MAL, LO R, KWONG RW, YAMAGISHI K, FISCHER RL, GOLDBERG RB & HARADA JJ (1998) *Arabidopsis* *LEAFY* *COTYLEDON1* is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. **Cell** 93: 1195-1205

LYNN K, AIDA M, SEDBROOK J, MASSON P, TASAKA M AND BARTON MK (1999) The *PINHEAD/ZWILLE* gene acts pleiotropically in *Arabidopsis* development and has overlapping functions with the *ARGONAUTE 1* gene. **Development** 126: 469-481

MAJEWSKA-SAWKA A, NOTHNAGEL EA (2000) The Multiple Roles of Arabinogalactan Proteins in Plant Development **Plant Physiology** 122: 3-9

MAYER U & JURGENS G (1998) Pattern formation in plant embryogenesis: a reassessment. **Seminars in Cell and Developmental Biology** 9: 187-193

MAYER KF, SCHOOF H, HAECKER A, LENHARD M, JURGENS G & LAUX T (1998) Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in *Arabidopsis* shoot meristem. **Cell** 95: 805-815

MENÉNDEZ-YUFFÁ A & GARCÍA DE GARCÍA E (1997) Morphogenic events during indirect somatic embryogenesis in coffee “Catimor”. **Protoplasma** 199: 208-214

MEURER CA, DINKINS RD, REDMOND CT, McALLISTER KP, TUCKER DT, WALKER DR, PARROTT WA, TRICK HN, ESSIG JS, FRANTZ HM, FINER JJ, COLLINS GB (2001) Embryogenic response of multiple soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] cultivars across three locations. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant** 37: 62-67

MICHALCZUK L, RIBNICKY DM, COOKE TJ AND COHEN JD (1992) Regulation of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in carrot cell cultures. **Plant Physiology** 100: 1346-1353

MOHAN M, NAIR S, BHAGWAT A, KRISHNA TG, YANO M, BHATIA CR, SASAKI T (2004) Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. **Molecular Breeding** 3: 87-103

MONTEIRO M, APPEZZATO-DA-GLÓRIA B, VALARINI MJ; DE OLIVEIRA CA, VIEIRA MLC (2003) Plant regeneration from protoplasts of alfalfa (*Medicago sativa*) via somatic embryogenesis. **Scientia Agricola** 60(4): 683-689

MURASHIGE T & SKOOG F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15: 473-497

MUTHUKUMAR B, MARIAMMA M, GNANAM A (1995) Regeneration of plants from primary leaves of cowpea. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 42:153-155

NISHIWAKI M, FUJINO K, KODA Y, MASUDA K & KIKUTA Y (2000) Somatic embryogenesis induced by the simple application of abscisic acid to carrot (*Daucus carota* L.) seedlings in culture. **Planta** 211: 756-759

NOMURA K & KOMAMINE A (1985) Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. **Plant Physiology** 79: 988-991

OGAS J, KAUFMANN S, HENDERSON J, SOMERVILLE C (1999) PICKLE is a CHD3 chromatin-remodeling factor that regulates the transition from embryonic to vegetative development in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 96(24): 13839-13844

ONYENEKWE PC, NJOKU GC, AMEH DA (2000) Effect of cowpea (*Vigna unguiculata*) processing methods on flatus causing oligosaccharides. **Nutritional Research** 20: 349-358

PARAMESWARI N, SKEPPER J, HANKKE D (2006) Identification of a potential structural marker for embryogenic competency in the *Brassica napus* spp. *oleifera* embryogenic tissue. **Plant Cell Reports** 25: 887-895

PARROT WA, WILLIAMS EG, HILDEBRAND DF, COLLINS GB (1989) Effect of genotype on somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 16: 15-21

PARROT WA (1990) Auxin-stimulated somatic embryogenesis from immature cotyledons of white clover. **Plant Cell Reports** 10: 17-21

PASTERNAK T, PRINSEN E, AYAYDIN F, MISKOLCZI P, POTTERS G, ASARD H, VAN ONCKELEN H, DUDITS D & FEHÉR A (2002) The role of auxin, pH and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Plant Physiology** 129: 1807-1819

PELLEGRINESCHI A, FATOKUN CA, THOTTAPPILLY G, ADEPOJU AA (1997) Cowpea embryo rescue. 1. Influence of culture media composition on plant recovery from isolated immature embryos. **Plant Cell Reports** 17: 133-138

PENNELL RI & LAMB C (1997) Programmed Cell Death in Plants. **The Plant Cell** 9: 1157-1168

PEPELKA JC, TERRY N, HIGGINS TJV (2004) Gene technology for grain legumes: can it contribute to the food challenge in developing countries? **Plant Science** 167: 195-206

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

QUIROZ-FIGUEROA FR, MÉNDEZ-ZEEL M, SÁNCHEZ-TEYER F, ROJAS-HERRERA R, LOYOLA-VARGAS VM (2002a) Differential gene expression in embryogenic and non-embryogenic clusters from cell suspension cultures of *Coffea Arabica*. **Journal of Plant Physiology** 159: 1267-1270

QUIROZ-FIGUEROA FR, FUENTES-CERDA CFJ, ROJAS-HERRERA R, LOYOLA-VARGAS VM (2002b) Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. **Plant Cell Reports** 20:1141-1149

QUIROZ-FIGUEROA FR, ROJAS-HERRERA R, GALAZ-AVALOS RM, LOYOLA-VARGAS VM (2006) Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 86: 285-301

RAMAKRISHNAN K, GNANAM R, SIVAKUMAR P, MANICKAM A (2005a) In vitro somatic embryogenesis from cell suspension cultures of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. **Plant Cell Reports** 24: 449-461

RAMAKRISHNAN K, GNANAM R, SIVAKUMAR P, MANICKAM A (2005b) Developmental pattern formation of somatic embryos induced in cell suspension cultures of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. **Plant Cell Reports** 24: 501-506

REINERT J (1958) Untersuchungen über die Morphogenese an Gewebekulturen. **Ber Dtsch Bot Ges** 71: 15

RIBNICKY DM, COHEN JD, HU WS & COOKE TJ (2002) An auxin surge following fertilization in carrots: a mechanism for regulating plant totipotency. **Planta** 214: 505-509

SAGARE AP, LEE YL, LIN TC, CHEN CC & TSAY HS (2000) Cytokinin-induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Corydalis yanhusuo* (Fumariaceae) – a medicinal plant. **Plant Science** 160: 139-147

SAMAJ J, BALUSKA F, BOBÁK M, VOLKMANN D (1999) Extracellular matrix surface network of embryogenic units of friable maize callus contains arabinogalactan-proteins recognized by monoclonal antibody JIM4. **Plant Cell Reports** 18: 369-374

SENGER S, MOCK HP, CONRAD U & MANTEUFFEL R (2001) Immunomodulation of ABA function affects early events in somatic embryo development. **Plant Cell Reports** 20: 112–120

SHETTY K, MCKERSIE BD (1993) Proline, thioproline and potassium mediated stimulation of somatic embryogenesis in alfalfa. **Plant Science** 88: 185–193

SINGH ND, SAHOO L, SARIN NB, JAIWAL PK (2003) The effect of TDZ on organogenesis and somatic embryogenesis in pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp) **Plant Science** 164: 341-347

SIMMONDS DH, DONALDSON PA (2000) Genotype screening for proliferative embryogenesis and biolistic transformation of short-season soybean genotypes. **Plant Cell Reports** 19: 485-490

SLESAK H, POPIELARSKA M, GÓRALSKI G (2005) Morphological and histological aspects of 2,4-D effects on rape explants (*Brassica napus* cv. Kana) cultured *in vitro*. **Acta Biologica Cracoviensis** 47(1): 219-226.

SMITH DL, KRIKORIAN AD (1989) Release of somatic embryogenic potential from excised zygotic embryos of carrot and maintenance of proembryonic cultures in hormone-free medium. **American Journal of Botany** 76: 1832-1843

STEWART FC, MAPES MO, MEARS K (1958) Growth and organized development of cultured carrots. II. Organization in cultures from freely suspended cells. **American Journal of Botany** 45: 705-708

STONE SL, KWONG LW, YEE KM, PELLETIER J, LEPINIEC L, FISCHER RL, GOLDBERG RB, HARADA JJ (2001) *LEAFY COTYLEDON2* encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 98(20): 11806-11811

SOMLEVA MN, SCHMIDT EDL, DE VRIES SC (2000) Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by SERK expression. **Plant Cell Reports** 19: 718-726

SORACE M, FARIA RT, YAMAMOTO LY, SCHNITZER JA, TAKAHASHI LSA (2007) Influência de auxina na aclimatização de *Oncidium baueri* (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias** 28(2): 195-200

TCHORBADJIEVA MI, KALMUKOVA RI, PANTCHEV IY, KYURKCHIEV SD (2005) Monoclonal antibody against a cell wall marker protein for embryogenic potential of *Dactylis glomerata* L. suspension cultures. **Planta** 222: 811-819

TEIXEIRA JB, JUNQUEIRA CS, PEREIRA AJP, MELLO RIS, SILVA APD, MUNDIM DA (2004) Multiplicação clonal de café (*Coffea arabica* L.) via embriogênese somática. **EMBRAPA Documentos, Brasília** 121: 01-39

THIRUVENGADAM M, VARISAI MOHAMED S, YANG CH, JAYABALAN N (2006) Development of an embryogenic suspension culture of bitter melon (*Momordica charantia* L.). **Scientia Horticulturae** 109: 123-129

THOMAS C, BRONNER R, MOLINIER J, PRINSEN E, VAN ONCKELEN H & HAHNE G (2002) Immuno-cytochemical localization of indole-3- acetic acid during induction of somatic embryogenesis in cultured sunflower embryos. **Planta** 215: 577-583

TOONEN MAJ, HENDRIKS T, SCHMIDT EDL, VERHOEVEN A, VAN KAMMEN A, DE VRIES SC (1994) Description of somatic-embryo-forming single cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking. **Planta** 194: 565-572

TORII KU, MITSUKAWA N, OOSUMI T, MATSUURA Y, YOKOYAMA R, WHITTIER RF AND KOMEDA Y (1996) The Arabidopsis *ERECTA* Gene Encodes a Putative Receptor Protein Kinase with Extracellular Leucine-Rich Repeats. **The Plant Cell** 8: 735-746

TROTOCHAUD AE, JEONG S & CLARK SE (2000) CLAVATA3, a multimeric ligand for the CLAVATA1 receptor-kinase. **Science** 289: 613-617

VAN HENGEL AJ, VAN KAMMEN A, DE VRIES SC (2002) A relationship between seed development, Arabinogalactan-proteins (AGPs) and the AGP mediated promotion of somatic embryogenesis. **Physiologia Plantarum** 114: 637-644

VAN HENGEL AJ, TADESSE Z, IMMERZEEL P, SCHOLS H, VAN KAMMEN A, DE VRIES SC (2001) *N*-Acetylglucosamine and Glucosamine-Containing Arabinogalactan Proteins Control Somatic Embryogenesis. **Plant Physiology** 125: 1880-1890

VENKOV P, TOPASHKA-ANCHEVA M, GEORGIEVA M, ALEXIEVA V, KARANOV E (2000) Genotoxic effect of substituted phenoxyacetic acids. **Archives of Toxicology** 74(9): 560-566

VERDUS MC, DUBOIS T, DUBOIS J, VASSEUR J (1993) Ultrastructural changes in leaves of *Chicorium* during somatic embryogenesis. **Annals of Botany** 72: 375-383

VON ARNOLD S, SABALA I, BOZHOKOV P, DYACHOK J, FILONOVA L (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 69: 233-249

WILLEMSSEN V, WOLKENFELT H, DE VRIEZE G, WEISBEEK P, SCHERES B (1998) The *HOBBIT* gene is required for formation of the root meristem in the *Arabidopsis* embryo. **Development** 125: 521-331

WILLIAMS EG, MAHESWARAN G (1986) Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany** 57: 443-462

YADEGARI R, PAIVA G, LAUX T, KOLTUNOW AM, APUYA N, ZIMMERMAN J, FISCHER RL, HARADA JJ & GOLDBERG RB (1994) Cell differentiation and morphogenesis are uncoupled in *Arabidopsis raspberry* embryos. **Plant Cell** 6: 1713-1729

ZALE JM, BORCHARDT-WIER H, KIDWELL KK, STEBER CM (2004) Callus induction and plant regeneration from mature embryos of a diverse set of wheat genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 76: 277-281

ZIMMERMAN JL (1993) Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. **The Plant Cell** 5: 1411-1423

ZUO J, NIU QW, FRUGIS G, CHUA NH (2002) The *WUSCHEL* gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. **Plant Journal** 30(3): 349-359