

U. PORTO

FC FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Mestrado em Fisiologia Molecular de Plantas

***Estudos de organogénese em
Cyphomandra betacea (Cav.) Sendt***

Ana Lúcia Martins dos Santos

Setembro de 2012



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Mestrado em Fisiologia Molecular de Plantas

*Estudos de organogénese em *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt*

Orientação:

Professor Doutor Jorge Manuel Pataca Leal Canhoto

(Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra)

Co-orientação

Professora Doutora Fernanda Fidalgo

(Faculdade de Ciências da Universidade do Porto)

Ana Lúcia Martins dos Santos

Setembro de 2012

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Fisiologia Molecular de Plantas, realizada sob a orientação do Professor Doutor Jorge Manuel Pataca Leal Canhoto (Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra) e co-orientação da Professora Doutora Fernanda Fidalgo (Faculdade de Ciências da Universidade do Porto)

No desenvolvimento das plantas, o ordinário torna-se extraordinário e o mundano torna-se miraculoso. Percebemos que os ramos crescem, os frutos amadurecem, as folhas caem e as sementes germinam. Contudo, quando tentamos entender os mecanismos envolvidos nesses eventos de desenvolvimento deparamo-nos com processos tão intrincados, complexos e súbitos que não conseguimos compreender seus detalhes...

Agradecimentos

Não poderia começar sem agradecer a todas as pessoas que sempre me apoiaram e que contribuíram para que o presente trabalho fosse realizado.

Ao Dr. Jorge Canhoto, meu orientador, primeiramente por me ter recebido no seu grupo de investigação. Agradeço ainda todos os conhecimentos que me transmitiu, todo o apoio e orientação científica, ajuda laboratorial e revisão do texto. Agradeço toda a compreensão pela minha condição de trabalhadora estudante, pela boa disposição e simpatia sempre demonstrados.

À Dra. Fernanda Fidalgo, minha co-orientadora, pela sempre pronta disponibilidade em tudo fazer para que este trabalho se realizasse.

À Dra. Ludovina Lopes, pelo apoio na parte laboratorial do trabalho quer a nível prático como a nível teórico, por todos os conselhos científicos e em especial por toda a atenção, disponibilidade e incentivo que me deu.

Ao Dr. Dias pela disponibilidade que demonstrou na orientação da componente de microscopia deste trabalho. Estou grata pelos conhecimentos imprescindíveis que me passou, pela paciência e ajuda que prestou na fase final do meu trabalho.

À Dona Eulalia Rosa, pela sempre pronta disponibilidade e preocupação na preparação do material necessário à realização do trabalho laboratorial, pela sua simpatia e amizade.

À Sandra Correia, pela sua facilidade e vontade de transmitir os seus conhecimentos, apoio, orientação e ajuda na parte experimental deste trabalho. Não menos importante quero ainda agradecer-lhe pela cedência de muito do material vegetal indispensável à realização deste trabalho.

Ao Pedro Antunes pela cedência de algum do material vegetal usado no trabalho e pelo companheirismo sempre demonstrado.

À Lara Currais por todo o apoio e orientação e ajuda na realização da componente de microscopia.

Ao Carlitos e ao Rui Costa pela preciosa ajuda na componente informática do trabalho.

A todos os professores, funcionários, colegas que se cruzaram comigo no laboratório e que de alguma forma contribuíram para que possa hoje apresentar este trabalho.

Aos meus colegas de trabalho da Direção Regional de Agricultura e Pescas do Centro, em especial ao Eng. Rui Catalão e ao Eng. Paulo Cordeiro em especial porque sempre foram ótimos colegas de equipa. Agradeço também aqueles que não conhecem o significado de companheirismo e trabalho em equipa, com eles também aprendi!

A todos os familiares, amigos, colegas, conhecidos que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

Ao Filipe por tudo...

E aos meus pais, por um sem fim de motivos...

A todos o meu muito obrigado.

Índice

Agradecimentos.....	v
Índice.....	vii
Lista de abreviaturas.....	ix
Resumo.....	x
Abstract.....	xi
1. Introdução.....	1
1.1. Contextualização do trabalho.....	2
1.2. O Tamarilho.....	2
1.2.1. Descrição da espécie.....	2
1.2.2. Importância e utilidade da espécie.....	6
1.3. Técnicas de propagação vegetativa de plantas.....	7
1.3.1. Métodos convencionais de propagação vegetativa.....	8
1.3.2. Métodos de propagação vegetativa in vitro.....	9
1.3.2.1. Tipos de propagação in vitro.....	10
1.3.2.1.1. Proliferação de meristemas.....	11
1.3.2.1.2. Organogénese.....	12
1.3.2.1.3. Embriogénese Somática.....	14
1.4. Reguladores de crescimento.....	15
1.5. Micropropagação em tamarilho.....	17
2. Objetivos.....	18
3. Materiais e métodos.....	20
3.1. Material vegetal.....	21
3.2. Métodos.....	21
3.2.1. Preparação dos meios de cultura.....	21
3.2.2. Indução de organogénese.....	24
3.2.3. Alongamento dos rebentos e enraizamento.....	25
3.2.4. Estudos histológicos.....	25
4. Resultados e discussão.....	28
4.1. Indução de organogénese e otimização das condições de indução.....	29
4.1.1. Tamarilho vermelho.....	29
4.1.1.1. 1º Ensaio.....	29

4.1.1.2.	2º Ensaio	35
4.1.1.3.	3º Ensaio	40
4.1.1.4.	Indução de organogénese em tamarilho vermelho – resumo do efeito de cada um dos reguladores de crescimento	43
4.1.2.	Organogénese em diferentes linhas de tamarilho	45
4.2.	Ensaio de enraizamento.....	49
4.3.	Estudos histológicos da organogénese.....	54
5.	Conclusões.....	57
6.	Referências bibliográficas.....	60

Lista de abreviaturas

Atm - Atmosferas

BAP – Benzilaminopurina

Cm – Centimetro

HCL – Acido clorídrico

IAA – Acido-3- indol-acético

IBA – Acido-3- indol-butírico

KOH – Hidróxido de potássio

Mg/L – Miligrama por litro

MI - Mililitro

MS – Murashige e Skoog (1962) (meio base)

NAA – Ácido α -naflaleno acético

TDZ – Tidiazurão

TA – Cultivar de tamarilho amarelo

TL – Cultivar de tamarilho laranja

T_{MIX} – Tamarilho mixoplóide

T_T – Tamarilho tetraplóide

TV – Tamarilho vermelho proveniente de Coimbra

TV_L – Tamarilho vermelho proveniente de Leiria

μ M – Micromolar

Resumo

Cyphomandra betacea (Cav.) Sendt. é uma espécie subtropical explorada pelos seus frutos, vulgarmente conhecida como tamarilho ou tomate de árvore. Os seus frutos são uma excelente fonte de provitamina A, vitaminas B6, C e E, ácido cítrico, carotenóides, flavonóides, antocianinas e outros compostos fenólicos. São ainda ricos em elementos minerais como ferro, potássio, cálcio, magnésio, zinco, mas pobres em hidratos de carbono, podendo ser consumidos frescos ou processados.

O objetivo deste trabalho foi testar diferentes condições de cultura com vista à indução de organogénese em segmentos foliares de diferentes proveniências, quer em termos de genótipo, quer do nível de ploidia.

A potencialidade organogénica dos explantes foi testada em meio base (MS) sem adição de hormonas (CB1), meio MS com várias concentrações de BAP (CB2 a CB4) e meio MS combinado com BAP e as auxinas NAA, AIA e IBA (CB5 a CB15 e CB17 a CB22) e ainda a auxina NAA e a citocinina TDZ isoladamente (CB5 e CB16, respetivamente).

Os primeiros indícios de morfogénese foram observados após 2 semanas de cultura em todos os meios testados, exceto no meio MS e nos meios onde se usou apenas IBA. No entanto, as respostas e estruturas formadas foram diferentes em função dos tratamentos tendo-se considerado o meio CB8 o mais consistente para a obtenção de plântulas de *Cyphomandra betacea* por organogénese, com uma taxa de indução de 87%. Dos genótipos estudados aquele que apresentou os melhores resultados foi o tamarilho vermelho proveniente de Coimbra (TV). Os estudos histológicos mostraram a formação de estruturas unipolares comprovando assim o carácter organogénico da resposta dos segmentos foliares.

Palavras chave: genótipo, regeneração *in vitro*, reguladores de crescimento, rizogénese, tamarilho

Abstract

Cyphomandra betacea (Cav.) Sendt. is a subtropical species exploited as a fruit crop, commonly known as tamarillo or tree tomato. The fruits are an excellent source of provitamin A, vitamins B6, C and E, citric acid, carotenoids, flavonoids, anthocyanins and other phenolics. Minerals such as iron, potassium, calcium, magnesium, zinc are still present in large amounts whereas the levels of carbohydrates are low. Fruits can be consumed fresh or processed in different ways.

The main goal of this study was to test different culture conditions for induction of organogenesis in leaf segments of different origins, both in terms of genotype and ploidy level.

The organogenic potential of explants was tested in basal medium (MS) without hormones (CB1), MS medium with different concentrations of BAP (CB2 to CB4), NAA (CB5), TDZ (CB16 and IBA (CB 21 and CB22) alone and MS medium combined with BAP and the auxins NAA, AIA and IBA (CB5 the CB15 and CB17 the CB22).

The first signs of morphogenesis were observed after 2 weeks of culture in all media tested, except in MS and in the media supplemented with IBA. However the responses and structures formed were strongly influenced by the treatments applied with the best results being obtained with treatment CB8, with an induction rate of 87%. The genotypes studied that presented the best results was the red tamarillo from Coimbra (TV). Histological studies showed that the structures formed from the leaves were unipolar, hence confirming the organogenic nature of the response.

Keywords: genotype, in vitro regeneration, growth regulators, rooting, tamarillo



1.Introdução

1.1. Contextualização do trabalho

O tamarilho – *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn. (Sin. *Solanum betaceum*) – é uma pequena árvore frutícola usada também como espécie ornamental. Os seus frutos, bem como os de outras espécies consideradas exóticas, atingem elevados preços constituindo, por esse motivo, uma importante fonte de rendimento e interesse para os produtores. Em Portugal, apesar de se reunirem as condições necessárias para o seu cultivo esta espécie ainda não tem grande expressão, contrariamente a países como o Perú, Chile e Argentina onde o seu cultivo é uma prática comum.

O tamarilho tem vindo a ser estudado no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra, com o intuito de se estabelecerem protocolos com vista à sua propagação através de várias técnicas de micropropagação.

1.2. O Tamarilho

1.2.1. Descrição da espécie

Cyphomandra betacea (Cav.) Sendtn vulgarmente designada por tamarilho, mas também conhecida por tomate-de-árvore, tomate-arbóreo ou tomate inglês (*Tree tomato* e *Arbol de Tomate*)^{1,2,3} é uma espécie pertencente à classe Magnoliopsida e à família Solanaceae, tendo sido descrita pela primeira vez em 1801 por Cavanilles (Cav.) com o nome de *Solanum betaceum*. Mais tarde, em 1945, foi transferida para o género *Cyphomandra* por Sendtner (Sendtn.)¹.

Esta planta é originária da América do Sul, mais precisamente da região dos Andes: Perú, Chile, Bolívia e Argentina, onde é amplamente cultivada^{5,6,7,8}(Fig. 1). O seu cultivo é hoje comum em áreas tropicais como a América Central e Índias Ocidentais, tendo sido introduzido também no sul da Europa e nas ilhas portuguesas dos Açores e Madeira^{9,10,11,12}.

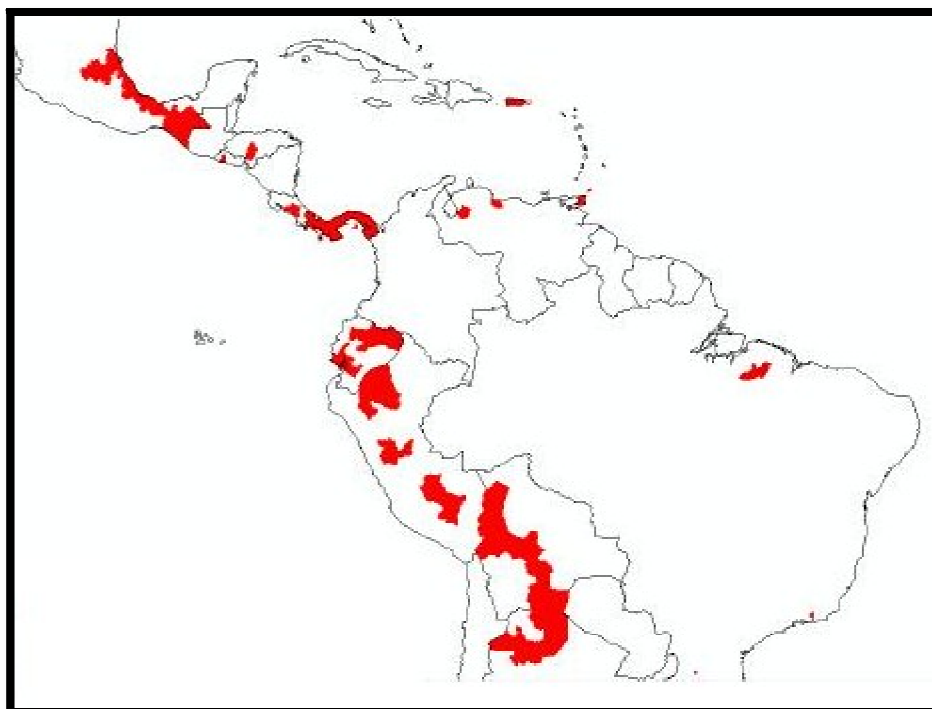


Figura 1 – Distribuição aproximada do tamarilho na América do Sul e Central⁷.

Assim, hoje em dia, para além dos seus locais de origem, esta espécie é maioritariamente cultivada no Brasil, Colômbia, Venezuela, Equador, Califórnia, Portugal, Quênia, Índia, Indonésia e Austrália^{13,14,15,16}.

Apesar de se encontrar esta espécie frequentemente em pomares e jardins de zonas de clima temperado¹⁵, apenas recentemente se generalizou o interesse por esta espécie, interesse esse ligado essencialmente aos seus frutos.

O tamarilho é proveniente de habitats com climas sub-tropicais e altitudes entre os 700 e os 2000 metros, chegando aos 2300 metros de altitude nas zonas de onde é nativo^{6,8,17}. Em climas frios, desenvolve-se melhor em altitudes mais baixas e temperaturas acima dos 10°C^{18,19,20}, podendo então crescer em climas mais frios o que tem aumentado o interesse pela sua cultura em países como Portugal¹⁷.

Embora esta planta possa crescer em vários tipos de solo, devido ao seu sistema radicular superficial desenvolve-se melhor em solos férteis, bem drenados e ricos em matéria orgânica, não tolerando solos compactados e pouco oxigenados^{8,20,21}. As principais limitações ao cultivo desta espécie são impostas essencialmente pela temperatura (temperaturas elevadas e seca prolongada), ventos fortes, solos inundados e geada^{1,10,19}. Apesar do tamarilho requerer um período de baixas

temperaturas ao longo do ano para crescer, nas regiões temperadas, as temperaturas muito baixas no inverno e Primavera, e as geadas do Outono, limitam a sua cultura em larga escala^{1,7,10,15}.

O tamarilho é uma espécie bastante resistente a pragas e doenças, podendo no entanto ser atacado por pulgões verdes, moscas da fruta, vírus da batateira, vírus do mosaico do pepino e míldio^{1,22,23,24}. As infeções provocadas por este fungo não só afetam o vigor e saúde da árvore como também causam distorção das folhas e induzem o aparecimento de pequenas manchas na periderme do fruto, reduzindo o seu valor comercial²⁵.

No que respeita à sua morfologia o tamarilho é uma pequena árvore perene de crescimento rápido, que pode atingir 2 a 5 metros de altura, não ultrapassando os 7 metros^{1,8,15}. As imagens da figura 2 apresentam uma árvore adulta de tamarilho laranja, que se encontra num jardim privado no concelho de Águeda e uma árvore de tamarilho vermelho proveniente do Jardim Botânico de Coimbra.



Figura 2- Árvores de tamarilho. **A:** tamarilho vermelho existente no Jardim Botânico de Coimbra; **B:** tamarilho laranja.

É uma planta hermafrodita de folhas sempre verdes, alternas, ovadas, pontiagudas no ápice, ligeiramente pubescentes e de grandes dimensões (entre 10 a 20 cm de largura e 15 a 30 de comprimento)^{1,17,26}.

As flores (Fig. 3) são pequenas e rosadas desenvolvendo-se em pequenos grupos nas extremidades dos ramos^{1,2,16}, entre a Primavera e o Verão, e a sua polinização é cruzada ou autogâmica³.



Figura 3 – Pormenor das flores do tamarilho

Os frutos (Fig. 4) são ovais com tamanhos a variarem entre os 5 a 10 cm de comprimento e os 3 a 5 cm de largura, com longos pedúnculos, podem aparecer isolados ou em grupos de 2 a 12^{1,4,17}. Estes atingem a maturidade entre Outubro e Abril, altura em que podem apresentar várias colorações, como, vermelho, violeta, laranja e amarelo, dependendo da cultivar²⁷, como se poderá verificar nas imagens da figura 4, abaixo apresentada. Os frutos são comestíveis, mas o seu epicarpo é espesso apresentando um gosto desagradável, devendo por isso ser removido antes da sua ingestão; já a sua polpa é succulenta e apresenta sabor agridoce^{1,16,17}.



Figura 4 - Pormenor dos frutos de duas variedades de tamarilho: A. tamarilho vermelho ainda verde; B. tamarilho amarelo; C. tamarilho vermelho praticamente maduro.

Das cultivares de tamarilho mais conhecidas distinguem-se três tipos: o tamarilho vermelho, o tamarilho amarelo e o tamarilho laranja, diferindo entre si, como já foi referido, pela cor da periderme, mas também pela consistência, cor e sabor da polpa.

1.2.2. Importância e utilidade da espécie

Esta espécie é cultivada com vista à exploração dos seus frutos comestíveis, que podem ser consumidos de várias maneiras: ao natural, sopas, sobremesas, molhos, sumos, saladas, entre outras^{15,28,29,30}.

O interesse por esta espécie não se prende apenas com o seu potencial de nova cultura, mas também pelo teor de alguns compostos que ocorrem nos frutos^{2,8,28,29}. De facto, o fruto do tamarilho é uma excelente fonte de provitamina A, vitaminas B6, C e E, ácido cítrico, carotenóides, flavonóides, antocianinas e compostos fenólicos, elementos minerais como ferro, potássio, cálcio, magnésio, zinco, sendo pobres em hidratos de carbono^{30,31,32,33}. Apesar das propriedades dos compostos acima referidos, os estudos nesta espécie são ainda reduzidos²⁹. No entanto, nos últimos anos alguns trabalhos foram realizados no intuito de avaliar o conteúdo em carotenóides e antocianinas nos frutos de tamarilho^{34,35,36}.

As antocianinas e os carotenóides não são apenas pigmentos naturais responsáveis pela cor dos frutos, mas são também compostos bioativos com propriedades biológicas, terapêuticas e preventivas, pelo que se estes frutos os possuem, o seu consumo pode conferir alguma proteção contra várias doenças neurodegenerativas^{2,28,34}.

Alguns estudos referem ainda o uso da espécie na medicina popular: contra infeções no fígado^{15,30}. No Equador o sumo do fruto maduro é usado para curar amigdalites, colesterol alto e dores de estômago e as suas folhas são usadas para curar doenças da garganta^{10,29}, cefaleias, obesidade e hipertensão⁴. A ingestão do fruto está contraindicada para quem sofre de alergias da pele, tensão baixa e urticária⁴.

1.3. Técnicas de propagação vegetativa de plantas

A propagação vegetativa é por definição, a capacidade apresentada por uma planta de originar indivíduos geneticamente idênticos entre si e à planta original a partir de um órgão, tecido ou célula³⁷.

Os organismos apresentam dois tipos de reprodução, a reprodução assexuada e a reprodução sexuada. Na reprodução assexuada um indivíduo, através de divisões exclusivamente mitóticas, origina células filhas com a mesma informação genética, ao passo que na reprodução sexuada há fusão de gâmetas e combinação dos genótipos de duas células diferentes, permitindo por isso uma maior variabilidade genética³⁸

Nas plantas superiores, apesar da reprodução sexuada ser o principal método de propagação, existe um conjunto diversificado de mecanismos que permitem a reprodução assexuada, conhecidos por técnicas de multiplicação vegetativa³⁸.

A propagação vegetativa, além de ser um importante método para a multiplicação de plantas lenhosas, oferece vantagens quando comparada com a reprodução sexuada, tais como, manter a informação genética. No entanto, nem todas as espécies apresentam o mesmo potencial em termos de clonagem, existindo uma grande variabilidade na facilidade de se reproduzirem assexuadamente, que vai desde

a sua propagação sem dificuldades até à impossibilidade de propagação por métodos de multiplicação vegetativa³⁷.

1.3.1. Métodos convencionais de propagação vegetativa

A propagação vegetativa realizada através de estacas é um dos métodos mais importantes e comuns na multiplicação de espécies lenhosas e arbustivas ornamentais^{38,39,40}. Este processo de multiplicação consiste na capacidade de uma parte vegetativa de uma planta se desenvolver sem a presença da planta mãe. Neste sistema, secções do caule são induzidas a formar raízes, enquanto que os meristemas axilares que possuem permitem o desenvolvimento da parte caulinar. Em algumas espécies o enraizamento é espontâneo sem necessidade de adicionar reguladores de crescimento, noutras, porém, são necessários tratamentos com reguladores de crescimento vegetal, geralmente auxinas³⁸. Para as espécies que podem ser facilmente propagadas por estacas, este método tem inúmeras vantagens. Trata-se de um método económico, rápido, simples e que não exige técnicas complexas³⁹.

Outra técnica de propagação convencional é a enxertia. Esta consiste em associar uma porção de caule ou ramo da planta que interessa multiplicar (enxerto) a um portaenxertos (ou cavalo) que possua um sistema radicular eficaz. Neste caso, não ocorre formação *de novo* de meristemas, pois os meristemas caulinares já existem na planta e as raízes são fornecidas pelo portaenxertos^{38,39}.

Muitas espécies lenhosas têm sido propagadas vegetativamente por estacaria ou enxertia, sendo sem dúvida estes os métodos tradicionais de propagação vegetativa mais utilizados³⁸. No entanto, as maiores dificuldades encontradas na aplicação destas técnicas referem-se à rápida perda de capacidade morfogénica dos tecidos com o seu envelhecimento, dificultando assim o processo de enraizamento⁴⁰. Assim, nem todas as espécies são fáceis de enraizar e, em muitos casos, verifica-se uma rejeição à enxertia sem que se conheçam as causas que estão na sua origem³⁸. Por outro lado, em alguns casos a propagação vegetativa só pode ser realizada em plantas jovens, ainda longe da manifestação das características pelas quais as plantas são selecionadas^{37,38,41}. Outras limitações consistem no número reduzido de plantas que se

obtém, na morosidade do processo e na disponibilidade de meios para a realização das técnicas³⁸.

Técnicas de propagação vegetativa *in vitro*, têm possibilitado a reprodução de espécies lenhosas recalcitrantes ao enraizamento, demonstrando inúmeras vantagens quando comparadas com técnicas *ex vitro*.

1.3.2. Métodos de propagação vegetativa *in vitro*

A multiplicação *in vitro* tem assumido ao longo dos tempos uma maior importância e um dos seus maiores benefícios prende-se com a possibilidade de seleccionar e multiplicar características interessantes do ponto de vista da variabilidade genética por meio da propagação clonal, tornando-se uma ferramenta poderosa associada aos programas de melhoramento genético⁴². A micropropagação possibilita ainda a manipulação e propagação de plantas de forma contínua, independentemente da época do ano e de uma forma mais rápida que os métodos convencionais de propagação vegetativa e, ainda, a possibilidade de obtenção e manutenção de um número elevado de plantas livres de doenças, e o estabelecimento de bancos de germoplasma^{38,40,43}.

A cultura de tecidos é a tecnologia do crescimento de células, tecidos ou órgãos vegetais isoladamente da planta mãe, ou seja, num meio artificial, e inclui técnicas e métodos utilizados para investigação em muitas áreas científicas, apresentando várias aplicações práticas⁴⁴. Assim, a investigação científica ampliou os métodos pelos quais as plantas podem ser propagadas vegetativamente. A clonagem de plantas *in vitro*, também designada micropropagação, é a aplicação comercial mais importante da cultura de tecidos⁴⁵ e, consiste na multiplicação de plantas em condições laboratoriais⁴⁶. A cultura de tecidos é uma técnica baseada na totipotência celular, que consiste na capacidade de uma célula, sob a ação de estímulos adequados, ter a capacidade de originar uma nova planta^{38,47}. Este processo de formação de órgão ou estruturas *de novo* é designado por morfogénese e pode ser de dois tipos, consoante o tipo de órgãos em que resulta; são eles, organogénese quando resulta na produção de

raízes ou rebentos caulinares, e embriogênese somática quando resulta na produção de embriões somáticos^{44,48}.

O crescimento das plantas superiores depende da repartição organizada de funções nos seus órgãos e, por essa razão, a formação de tecidos não organizada é pouco comum na natureza, mas ocorre frequentemente quando se procede à cultura de plantas ou partes dela *in vitro*⁴⁴. Estes tecidos possuem um número limitado de células especializadas ou diferenciadas e consistem fundamentalmente numa massa de células sem qualquer estrutura reconhecível, vulgarmente chamado calo⁴⁴.

A cultura *in vitro* apresenta vantagens relativamente aos métodos convencionais de propagação vegetativa, destacando-se a maior rapidez no processo, a possibilidade de multiplicar espécies que dificilmente se multiplicariam *in vivo*, o controlo dos agentes patogénicos contaminantes, a possibilidade de eliminar o efeito da sazonalidade no desenvolvimento das planta e o menor requerimento em termos de espaço para manutenção das culturas^{38,41,44,47}.

1.3.2.1. Tipos de propagação *in vitro*

A propagação de plantas *in vitro* inclui técnicas e métodos utilizados consoante os objetivos a atingir, sendo para isso necessário fazer variar as condições e meios de cultura e o tipo de explante^{44,46}. As técnicas usadas são a proliferação de gemas axilares, indução e proliferação de gemas adventícias (organogênese) e a embriogênese somática^{40,46,47,48}. Rebentos caulinares, raízes e embriões podem surgir de uma única célula ou grupos de células, que são induzidos a entrar em divisão celular pelas condições da cultura.

A indução e expressão das possíveis respostas morfogénicas em cultura de células, tecidos ou órgãos *in vitro*, são dependentes de fatores externos, químicos e físicos, como o meio de cultura, os reguladores de crescimento, bem como de fatores inerentes ao material vegetal, como o estado fisiológico do explante e/ou da planta que o originou, as condições ambientais, fitossanitárias e nutricionais em que a planta mãe foi originada e dos próprios fatores hereditários^{40,49}.

Estas técnicas de propagação têm sido observadas em vários tipos de plantas, havendo, contudo, espécies que se têm evidenciado recalcitrantes a estas metodologias.

1.3.2.1.1. Proliferação de meristemas

A cultura de meristemas caulinares isolados ou inseridos em ápices ou segmentos nodais é o tipo mais simples de micropropagação, já que não se baseia na indução de novos meristemas, mas sim no desenvolvimento dos já existentes no explante^{38,44,50}. Muitos dos meristemas caulinares (axilares) encontram-se em estado dormente nas plantas, mas quando em contacto com um meio adequado, esse estado de dormência é quebrado e o seu desenvolvimento é promovido^{38,44,51}.

A cultura de meristemas pode ser utilizada para diversas funcionalidades, no entanto, a sua aplicação mais importante está relacionada com a propagação de plantas em larga escala, tratando-se de uma alternativa para as plantas em que a aplicação das técnicas tradicionais é difícil^{38,43}.

A micropropagação através da proliferação de meristemas compreende as fases de multiplicação, alongamento e enraizamento e aclimação *ex-vitro*. A técnica inicia-se com a cultura, *in vitro*, do meristema/explante num meio de cultura adequado que promove a sua proliferação, da qual resulta um novo rebento³⁸. O rebento originado desenvolve gemas ao longo do seu eixo o que permite, ao cultivá-las novamente, repetir o processo infinitamente³⁸. A planta originada é geneticamente igual à que cedeu o material vegetal que lhe deu origem^{38,43,44}.

O sucesso da técnica pode ser afetado por diversas variáveis, como o genótipo e estado de maturação⁵², condições fitossanitárias e nutricionais da planta mãe, a seleção e colheita dos explantes e sua posterior desinfeção e isolamento em condições assépticas, a composição do meio de cultura e a manipulação das culturas^{38,43,44}. Como referi, um aspeto importante a ter em conta quando se utiliza esta técnica prende-se com a composição dos meios de cultura e com a necessidade de adição de citocininas, uma vez que estas são responsáveis por contrariar a dominância apical e favorecem o crescimento. Por outro lado, a importância de se adicionar a referida hormona explica-se por o principal local onde ocorre a sua síntese ser nas raízes, das quais os

meristemas em cultura são desprovidos. Mesmo que estes possam sintetizar citocininas, estas não serão, provavelmente, suficientes para suportar o seu crescimento.

1.3.2.1.2. Organogénese

Em cultura de tecidos, organogénese é o processo de diferenciação através do qual órgãos da planta, como raízes, rebentos caulinares ou flores são formados a partir de explantes onde ocorreu a formação de meristemas adventícios^{50,53}. Isto significa que os órgãos formados resultam de novos meristemas e não a partir de meristemas já existentes no explante.

Existem dois tipos de organogénese, a organogénese direta e a organogénese indireta. A organogénese direta caracteriza-se por não ocorrer a formação de calo^{50,54,55}. Neste caso, os precursores imediatos dos novos órgãos formados são as células existentes nos explantes, pelo que o fornecimento exógeno de hormonas pode facilitar o processo, mas não é absolutamente necessário para que a organogénese ocorra⁴⁸. A indução de regeneração direta de rebentos adventícios depende do órgão da planta do qual deriva o explante e, acima de tudo, da espécie⁴⁸. Em algumas espécies os rebentos adventícios surgem de tecidos de qualquer órgão (como folhas, caules, pétalas ou raízes), ao passo que, em outras espécies a regeneração ocorre numa gama limitada de tecidos⁴⁸.

Na organogénese indireta ocorre primeiro a formação de calo, antes da regeneração das gemas caulinares que posteriormente se diferenciam em rebentos^{48,50,54}. Normalmente os calos são repicados para um novo meio de cultura que irá promover a indução de rebentos caulinares e, posteriormente, esses rebentos são isolados e cultivados num meio de enraizamento⁵⁵. O fornecimento de fito-hormonas não só controla o processo de organogénese indireta como é necessário para que ele ocorra⁴⁸.

A via direta é a ideal na medida em que, evitando a passagem por uma fase de crescimento desorganizado característico da fase de calo, reduz a probabilidade de ocorrência de variação somaclonal, que consiste no aparecimento de plantas com novas características^{54,56}. No entanto, algumas das características específicas

resultantes do processo de variação somaclonal podem não ser desvantajosas. Algumas características como a tolerância aos stresses ambientais, a resistência a doenças e alteração da coloração das flores são exemplos que justificam a preservação destas variações, visando o aumento da variabilidade genética nas plantas^{57,58}.

A composição do meio de cultura influencia a indução de organogénese, pelo que as interações entre os diferentes reguladores de crescimento são determinantes para o órgão formado^{44,59}. Geralmente a indução de *callus* exige uma concentração de auxina superior à concentração de citocinina e, para a formação de gemas remove-se a auxina ou reduz-se a sua concentração, mantendo a citocinina⁶⁰. A percentagem de cada tipo de hormona necessário para a indução de organogénese varia de espécie para espécie^{41,58}.

A indução de organogénese depende ainda de fatores como a natureza do explante e das condições da cultura, de desenvolvimento^{52,61}, genótipo⁵⁵, idade e estado fisiológico da planta dadora⁵⁸.

Durante a organogénese os explantes são geralmente sujeitos a quatro estádios sequenciais, são eles, a indução de calo direta ou indireta, a formação de rebentos adventícios, a formação de raízes adventícias e a aclimação^{44,47,59}.

Apesar do processo de organogénese ser considerado um bom método de propagação, visto que de um único explante se podem formar muitos rebentos (ou seja, novas plantas) este apresenta algumas limitações, tais como, a oxidação de compostos fenólicos (particularmente em lenhosas), infeções, necessidade de utilização de vários meios de cultura (meio para indução, meio para alongamento dos rebentos e meio para enraizamento), perda de capacidade de regeneração com envelhecimento das culturas⁶³ e aparecimento de plantas vitrificadas^{40,57}.

No sentido mais lato podemos considerar que a multiplicação através da cultura de meristemas caulinares isolados ou integrados no ápice ou segmentos nodais é também um tipo de organogénese, visto que há também a formação de rebentos caulinares a partir dos meristemas. No entanto, esta técnica difere da organogénese pelo facto dos meristemas já existirem no explante, não sendo induzidos *de novo*. Desta forma, considera-se esta técnica de micropropagação diferente da organogénese embora as condições de enraizamento e aclimação dos rebentos

caulinares formados sejam similares às adotadas para o caso da regeneração por organogênese.

As técnicas de organogênese somática e embriogênese somática são, como já foi referido, as técnicas utilizadas por excelência para a cultura, melhoramento e transformação de plantas *in vitro*, no entanto, a organogênese somática é a técnica mais comum.

1.3.2.1.3. Embriogênese Somática

O termo embriogênese somática refere-se ao processo pelo qual células somáticas são capazes de formar embriões morfologicamente semelhantes ao embrião zigótico e, que passam pelas mesmas fases de desenvolvimento^{45,64}. Após germinação os embriões originam plântulas que são geneticamente idênticas à planta de onde se obtiveram os explantes. A embriogênese somática pode ser induzida a partir de uma grande diversidade de explantes, como sejam embriões zigóticos, ápices caulinares, entre muitos outros³⁰.

O processo de embriogênese somática pode decorrer de duas formas, a embriogênese somática direta e a embriogênese somática indireta. Na primeira, o embrião desenvolve-se a partir de uma simples célula, sem a formação prévia de calo; já na embriogênese indireta, ocorre primeiro a formação de calo⁴⁵. Esta última forma de embriogênese tem sido descrita para um maior número de espécies vegetais que a embriogênese somática direta⁴⁵.

Os primeiros sucessos com esta técnica foram obtidos na cenoura (*Daucus carota*), seguindo-se depois muitas outras espécies. No entanto, apesar do elevado número de protocolos para as mais variadas espécies, os casos em que a embriogênese somática é utilizada a uma escala comercial são ainda escassos⁵⁰. Os dados têm também mostrado que algumas famílias parecem ser mais suscetíveis à indução de embriogênese somática enquanto que outras, como as gramíneas, são mais recalcitrantes. Entre as espécies mais difíceis de propagar por esta técnica encontram-se as lenhosas, nas quais, com frequência, a embriogênese somática só é conseguida em explantes jovens, como embriões zigóticos⁵⁰. Em algumas espécies,

como por exemplo a cenoura, qualquer parte da planta pode ser usada como explante para o processo de embriogénese somática, já noutras espécies, como por exemplo os cereais, apenas certas regiões da planta respondem a este tipo de cultura⁵⁰.

Os principais fatores que influenciam a embriogénese somática estão relacionados com o genótipo da planta, com as condições físico-químicas em que as culturas se desenvolvem, ou com os fatores dependentes do próprio tecido como a idade e o estado fisiológico⁴⁶. No que respeita às condições físico-químicas, onde se incluem fatores mais facilmente manipuláveis, podem destacar-se a composição do meio de cultura e a temperatura, bem como, a intensidade e a quantidade de luz a que as culturas são expostas.

1.4. Reguladores de crescimento

Os reguladores de crescimento podem ser definidos como substâncias naturais ou sintéticas que podem ser aplicados diretamente nas plantas para alterar os seus processos vitais ou estruturais, com a finalidade de aumentar a sua produção e/ou melhorar a sua qualidade. Dentro do conceito de regulador de crescimento inclui-se o conceito de hormonas vegetais, também designadas por fito-hormonas, que ocorrem naturalmente nas plantas (substâncias naturais) ou podem ser aplicadas às plantas (substâncias sintéticas) influenciando os seus processos fisiológicos^{65,66,67}.

A designação de hormona é normalmente aplicada a seis tipos diferentes de compostos químicos, são eles: as auxinas, as citocininas, as giberelinas, o etileno, os brassinosteróides e o ácido abscísico^{68,69,70}. Recentemente, outros compostos revelaram papéis semelhantes aos anteriormente referidos, no entanto, IAA (ácido indolacético) é uma auxina natural^{70,71,72} e o 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e o NAA (ácido naftalenoacético) são de origem sintética, embora provoquem respostas equivalentes.

As auxinas foram as primeiras hormonas a serem descobertas e controlam vários aspetos do desenvolvimento das plantas^{38,72,73}, normalmente em interação com outras hormonas, como o etileno ou as citocininas³⁸. As auxinas estão envolvidas nos

tropismos, na regulação da dominância apical, na formação de meristemas florais e no estabelecimento dos padrões de filotaxia, na formação de raízes laterais, na diferenciação dos tecidos vasculares e no desenvolvimento dos frutos^{38,74}. Na cultura de tecidos *in vitro* a função das auxinas está associada à formação e manutenção de calo, indução de enraizamento, formação de embriões somáticos e formação de meristemas caulinares adventícios nos processos de organogênese^{38,71}. Assim, se se pretende induzir organogênese somática usam-se o IAA ou o NAA, para embriogênese somática utilizam-se o 2,4-D e o picloram, já o IBA (ácido-3-indol-butírico) é geralmente utilizado na indução de raízes adventícias³⁸.

Desde a descoberta das citocininas, em 1950 por Skoog e a sua equipa, que se estabeleceu o seu papel e atividade em vários processos do crescimento e desenvolvimento das plantas, como são exemplos, a indução de divisão celular, o adiamento da senescência e a regulação da dominância apical, a mobilização de nutrientes, a quebra da dormência e germinação das sementes e o controlo de genes envolvidos na regulação e funcionamento dos meristemas^{38,67,74}. As mais utilizadas nos meios de cultura são a benzilaminopurina (BAP) e o tidiazurão (TDZ)^{38,67,74}. Devido ao seu efeito na divisão celular, as citocininas são muitas vezes utilizadas em conjunto com as auxinas para promover a formação de *callus*^{38,72}.

As auxinas, as citocininas e o balanço entre estes dois tipos de reguladores de crescimento são, normalmente, considerados os fatores mais importantes no controlo da morfogênese *in vitro*^{38,74,75}. As concentrações de auxina e citocinina a utilizar nos meios de cultura devem ser manipuladas de forma a encontrar a concentração ideal em função do método utilizado, da espécie e do tipo de explante^{74,76}. Quando a concentração de auxina é mais elevada favorece-se a formação de raízes e concentrações mais reduzidas promovem a formação de calo, no entanto, a utilização de concentrações muito elevadas de auxinas pode provocar o crescimento de estruturas deficientes ou inibir completamente o crescimento celular^{74,75,76}. Quando se utilizam diferentes combinações de auxinas e citocininas é possível promover o crescimento diferenciado e a organogênese somática.

1.5. Micropropagação em tamarilho

A cultura de plantas *in vitro* é uma técnica que apresenta não só uma importância prática para a agricultura e floresta, como também na área científica básica. Para além do aspeto da micropropagação de espécies de interesse, com características selecionadas, os diferentes métodos de cultura podem constituir modelos experimentais para estudos de ciência prática e fundamental^{44,77}.

Ao longo dos anos, os estudos relativos à cultura de tecidos através de técnicas de micropropagação em *Cyphomandra betacea* têm vindo a aumentar¹², nomeadamente os trabalhos em que são usadas técnicas de proliferação de gemas axilares (meristemas)^{78,79,80,81,82}, os trabalhos em embriogénese somática^{83,84,85} e finalmente os trabalhos em organogénese somática a partir de explantes de folhas^{1,84} ou através de protoplastos⁸⁶, que têm dado um contributo importante para o aperfeiçoamento das técnicas de cultura de tecidos em tamarilho.

Os conhecimentos a nível da transformação genética de tamarilho têm sido evidenciados através de vários trabalhos nesse âmbito^{25,87,88,89}.

No que respeita aos trabalhos de micropropagação através da técnica de organogénese em tamarilho, os primeiros relatos indicam que é possível induzir a produção de rebentos a partir de pequenas secções de folhas e pecíolos inoculados em vários tratamentos com diferentes combinações dos reguladores de crescimento BAP e NAA^{1,25}.

A formação de rebentos a partir de embriões zigóticos, raízes, cotilédones e hipocótilos em meio contendo a citocinina BAP, foi também assinalada¹. Os embriões zigóticos quando cultivados em meio suplementado com BAP, em diferentes concentrações, desde 1 a 10 mg/L originaram formação de rebentos sendo a organogénese mais eficaz, com o aumento da concentração de citocinina. No entanto, a partir de um determinado nível de BAP (5 mg/L), o fenótipo dos rebentos caulinares era afetado pelas elevadas concentrações de BAP que não permitiam o seu alongamento¹.



2.Objetivos

O presente trabalho foi elaborado no âmbito de um das linhas de investigação que vem sendo desenvolvida no laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Ecologia Funcional da Universidade de Coimbra, relacionada com o melhoramento do tamarilho. Esta espécie tem sido propagada por embriogénese somática estando as condições de indução e desenvolvimento dos embriões somáticos bem estabelecidas. No entanto, os dados têm mostrado que este tipo de micropropagação leva ao aparecimento e um grande número de embriões somáticos anómalos, situação que limita a eficácia do processo de regeneração.

Deste modo, têm sido testados protocolos alternativos de propagação. A organogénese é um método de micropropagação com elevado potencial e que tem sido aplicado com sucesso em inúmeras espécies. Ensaio preliminares realizados em tamarilho e referidos na introdução mostraram que alguns explantes de tamarilho têm a capacidade de formar meristemas adventícios. Assim, o principal objetivo deste trabalho foi testar diferentes condições de cultura com vista à indução de organogénese em segmentos foliares de diferentes proveniências, quer em termos de genótipo, quer do nível de ploidia. Estes ensaios foram complementados com experiências de enraizamento dos rebentos obtidos e com análises histológicas do material em cultura.



3. Materiais e métodos

3.1. Material vegetal

Para a indução de organogénese somática em tamarilho, utilizaram-se secções de folhas jovens como explante. Estas folhas tiveram origem em plântulas de tamarilho de diferentes cultivares (tamarilho vermelho proveniente de Coimbra (TV) e de Leiria (TV_L), tamarilho amarelo (TA), tamarilho laranja (TL)) e com diferentes níveis de ploidia, tamarilho mixoplóide (T_{MIX}) e tamarilho tetraplóide (T_T) mantidos *in vitro* em meio MS⁵⁹ com 3% (p/v) de sacarose e 0,8% (p/v) de agar até se obter o tamanho de folhas ideal (1 – 1,5 cm). Segmentos foliares provenientes de plântulas resultantes do desenvolvimento de embriões zigóticos isolados e germinados *in vitro* em meio MS, foram também utilizados.

3.2. Métodos

3.2.1. Preparação dos meios de cultura

Neste trabalho, para todos os ensaios utilizou-se o meio MS⁵⁹ cuja composição base está indicada na tabela 1. A este meio foram adicionadas diferentes concentrações de reguladores de crescimento (Tab. 2).

Tabela 1- Composição do meio MS

Constituintes	Nutrientes	Concentração (mg/L)
Macronutrientes	KNO ₃	1900
	NH ₄ NO ₃	1650
	CaCl ₂ .2H ₂ O	440
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
	KH ₂ PO ₄	170
Micronutrientes	MgSO ₄ .4H ₂ O	22,30
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60
	H ₃ BO ₃	6,20
	KI	0,83
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0025
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0025
Fonte de ferro (FeEDTA)	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3
	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Compostos orgânicos	Glicina	2,0
	Ácido nicotínico	0,5
	Piridoxina H-Cl (vit. B6)	0,5
	Tiamina H-Cl (vit. B1)	0,1
Mioinositol	Mioinositol	100
Fonte de carbono	Sacarose	3%

Os diferentes meios foram preparados a partir de soluções stock de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, mio-inositol e FeEDTA (fonte de ferro). As soluções stock dos macronutrientes e da fonte de ferro foram mantidas a 4°C. As restantes soluções, bem como as soluções stock dos diferentes reguladores de crescimento, foram conservadas a -20°C.

Consoante se pretendia indução de organogénese, alongamento caulinar, indução de enraizamento ou manutenção das plântulas, prepararam-se diferentes

composições dos meios de cultura. Na tabela 2 que se apresenta em seguida pode verificar-se a composição dos diferentes meios de cultura.

Tabela 2 - Composição dos meios de cultura utilizados nas diferentes fases do processo de regeneração de plantas por organogénese

Meio	Composição	Finalidade	
CB1	MS	Manutenção das plântulas; controlo	
CB2	0,25 mg/L BAP	Indução de organogénese	
CB3	0,5 mg/L BAP		
CB4	1 mg/L BAP		
CB5	0,5 mg/L NAA		
CB6	0,25 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA		
CB7	0,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA		
CB8	1 mg/L BAP + 0,25 mg/L NAA		
CB9	1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA		
CB10	1 mg/L BAP + 0,05 mg/L NAA		
CB11	1 mg/L BAP + 0,01 mg/L NAA		
CB12	1 mg/L BAP + 0,25 mg/L AIA		
CB13	1 mg/L BAP + 0,1 mg/L AIA		
CB14	1 mg/L BAP + 0,05 mg/L AIA		
CB15	1 mg/L BAP + 0,01 mg/L AIA		
CB16	0,05mg/L TDZ		Alongamento caulinar
CB17	1 mg/L BAP + 0,25 mg/L IBA		
CB18	1 mg/L BAP + 0,1 mg/L IBA		
CB19	1 mg/L BAP + 0,05 mg/L IBA		
CB20	1 mg/L BAP + 0,01 mg/L IBA		
CB21	0,01 mg/L IBA	Enraizamento	
CB22	0,25 mg/L IBA		
CB23	0,2 mg/L BAP		
CB24	MS ₂ (sacarose a 2% e ½ macronutrientes)		
CB25	MS ₂ + 1 mg/L IBA		

Após adição de DiFco Bacto Agar (0,6% p/v) todos os meios foram distribuídos por tubos de ensaio e/ou caixas de petri (2,2 cm de diâmetro; cerca de 15 ml/tubo; 6 cm diâmetro, cerca de 15 ml/caixa; respetivamente) previamente identificados, os quais foram imediatamente rolhados com algodão cardado e gaze e autoclavados a uma temperatura de 120°C e 1,2 atm de pressão durante cerca de 20 minutos. O pH de todos os meios foi previamente ajustado para 5,6 – 5,8 com soluções diluídas de KOH ou HCl.

Todas as culturas foram realizadas em condições assépticas numa câmara de fluxo laminar horizontal, de forma a evitar contaminações.

3.2.2. Indução de organogénese

Para a indução de organogénese utilizaram-se segmentos foliares de plântulas mantidas *in vitro* como indicado na secção 3.1. Material vegetal.

As plântulas foram retiradas do tubo de ensaio e colocadas numa caixa de Petri. A zona apical (1 – 2 cm) foi removida e cultivada de novo no meio de manutenção de forma a obter novas plântulas. As plântulas de tamarilho para as diferentes culturas e, mantidas em meio MS, foram repicadas a cada 8 semanas, de forma a garantir sempre a disponibilidade e plantas com cerca de 4 semanas. Nas folhas removeu-se a nervura central e procedeu-se à sua divisão em quatro partes semelhantes (2 apicais e 2 basais). Esta divisão dependeu do tamanho das folhas, motivo pelo qual algumas das folhas (as mais apicais) tenham sido apenas divididas em 2 partes (apical e basal) por apresentarem um tamanho reduzido.

As secções obtidas foram colocadas individualmente e com a parte abaxial em contacto com os diferentes meios de cultura (CB1 a CB20 – Tab. 2). Os tubos de ensaio foram devidamente identificados com a variedade de tamarilho, o código do meio de cultura e a data da cultura e colocados numa estufa sob uma temperatura de 25°C, uma intensidade luminosa de 15 – 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR e um fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro. Para cada tratamento foram realizadas 3 repetições de 18 explantes cada para os ensaios com tamarilho vermelho e 10 explantes para as restantes linhas de tamarilho.

A cada 2 semanas de cultura avaliou-se o efeito das combinações hormonais e os seguintes parâmetros foram registados: a formação ou não de calo e gemas, a formação de rebentos, o tempo necessário à formação de rebentos e o número de rebentos formados.

3.2.3. Alongamento dos rebentos e enraizamento

Após 8 semanas no meio de indução, os explantes em que ocorreu formação de rebentos caulinares foram transferidos para um novo meio, constituído por uma concentração mais baixa da citocinina BAP (CB21 – Tab. 2), de forma a promover o seu alongamento. Após 4 semanas neste meio os rebentos foram transferidos para meios de enraizamento (CB22 e CB23 – Tab. 2) onde permaneceram durante 4 semanas. Após este período registaram-se o número de raízes formadas e o comprimento da raiz mais longa, tendo-se realizado três réplicas de 18 explantes/rebentos em cada tratamento (54 rebentos no total).

As plantas obtidas foram envazadas com terra e mantidas às condições de 25°C, fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro com intensidade luminosa de 15 – 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Cerca de meio ano mais tarde estas foram transferidas para vasos de maiores dimensões e, 2 meses mais tarde, estabelecidas em solo no Jardim Botânico de Coimbra.

3.2.4. Estudos histológicos

Com o intuito de verificar a partir de que estruturas se formariam os rebentos e que tipo de células estariam envolvidas no processo de organogénese, realizou-se um ensaio em que se pretendia realizar cortes histológicos das diferentes estruturas formadas ao longo do tempo de cultura dos explantes e até ao início da formação dos rebentos.

Sendo que os primeiros sinais de morfogénese se observaram ao fim de 1 – 2 semanas de cultura e a formação dos rebentos se verificava a partir das 3 – 4 semanas de cultura dos explantes, entendeu-se que seria até sensivelmente esse período que

haveria interesse em observar que células ou grupos de células estariam envolvidas no processo de organogénese somática. Desta forma estipulou-se uma data para seleção e fixação do material vegetal para estudo e a partir dessa data preconizou-se as datas de inoculação/cultura dos explantes. Procedeu-se à cultura de explantes nos seguintes intervalos de tempo: 4 dias, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas e 4 semanas e, no tratamento constituído por MS suplementado com 1,0 mg/L de BAP e 0,25 mg/L de NAA (CB8), procedendo-se igualmente à cultura de explantes em tratamento sem adição de qualquer hormona (CB1), funcionando este último como controlo.

Assim, as amostras foram fixadas numa solução de glutaraldeído 2,5% em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M e pH 7,2, adicionando-se uma gota de cloreto de cálcio por cada 5 mL desta solução, durante 2 – 4 horas à temperatura ambiente. Em seguida o material foi submetido a 3 lavagens no tampão cacodilato durante 15 minutos por lavagem e pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1% preparado no mesmo tampão, durante 1 – 2 horas, à temperatura ambiente. Posteriormente, o material foi submetido a três lavagens, com a duração de 15 minutos cada, em tampão, em tampão e água destilada (1:1) e em água destilada, respetivamente. As amostras foram depois imersas em acetato de uranilo 1% aquoso, durante uma hora no escuro. Após este período foram novamente lavadas em água destilada (2 vezes durante 15 minutos) e desidratadas em soluções crescentes de etanol e água (70, 80, 90, 95 e 100%). Finalmente, procedeu-se à sua impregnação em solução de resina de *Spurr* e etanol 100% durante 2 – 4 horas cada, após o que permaneceram em resina pura *overnight*. Para a inclusão usaram-se moldes de borracha onde se posicionaram as amostras e se preencheram com resina. Os moldes foram deixados a polimerizar durante 24 horas numa estufa a 60°C.

Dos blocos com as amostras foram obtidos cortes semi-finos (0,5 – 2 µm de espessura) com facas de vidro, num ultramicrótomo LKB Ultrame II. Os referidos cortes foram depositados numa gota de acetona (20%), em lâminas, que foram levadas a secar a 60°C durante 15 minutos.

Posteriormente procedeu-se à coloração dos cortes finos com uma solução de azul de toluidina (solução aquosa de azul de toluidina 1%, azur II 1% e borato de sódio 1%). Os cortes foram cobertos com uma gota da solução corante durante 30 minutos,

à temperatura ambiente. Seguiu-se a lavagem das lâminas duas vezes em água destilada que foram deixadas a secar à temperatura ambiente.

A observação dos cortes semifinos foi efetuada num microscópio ótico Nikon Eclipse E400, registando-se as imagens com interesse com uma máquina fotográfica digital Nikon Digital Sight DS.U1 e o software Act-2U.



4. Resultados e discussão

4.1. Indução de organogénese e otimização das condições de indução

O efeito de diferentes meios de cultura na indução de organogénese em 6 linhas de tamarilho foi analisado por observações periódicas das culturas (de duas em duas semanas) e os resultados finais registados após 8 semanas de cultura.

4.1.1. Tamarilho vermelho

4.1.1.1. 1º Ensaio

No primeiro ensaio foi testado apenas o tamarilho vermelho de Coimbra (TV) em diferentes meios de cultura nos quais se fez variar as concentrações de BAP e NAA. Os resultados obtidos estão expressos na tabela 3 e na figura 5. Como se pode verificar foram obtidos calo em todos os meios, à exceção do meio base (CB1). Verificou-se também a formação de calo em meios contendo apenas a citocinina BAP (CB2 a CB4). No que respeita à formação de rebentos caulinares os resultados mostraram que nos meios CB4 e CB8 o número de rebentos formado foi bastante superior aos restantes meios (CB2, CB3, CB6 e CB7), nos quais o número de rebentos formado foi muito baixo. Observou-se ainda que nos meios CB1 (meio base) e CB5 não ocorreu formação de qualquer rebento. A percentagem de indução de organogénese dos meios testados está indicada na tabela 3 e figura 5.

Tabela 3 – Indução de organogênese em tamarilho após 8 semanas de cultura
(Diferentes estruturas formadas: S – Ocorreu formação; N – Não ocorreu formação)

Tratamento	Nº de explantes	% de resposta	Calos	Nódulos/gemas	Raízes	Nº de Rebentos
CB1	18	0%	N	N	N	0
CB2	18	6%	S	S	N	1
CB3	18	6%	S	S	N	1
CB4	18	56%	S	S	N	10
CB5	18	0%	S	N	S	0
CB6	18	17%	S	S	S	3
CB7	18	17%	S	S	S	3
CB8	18	78%	S	S	N	14

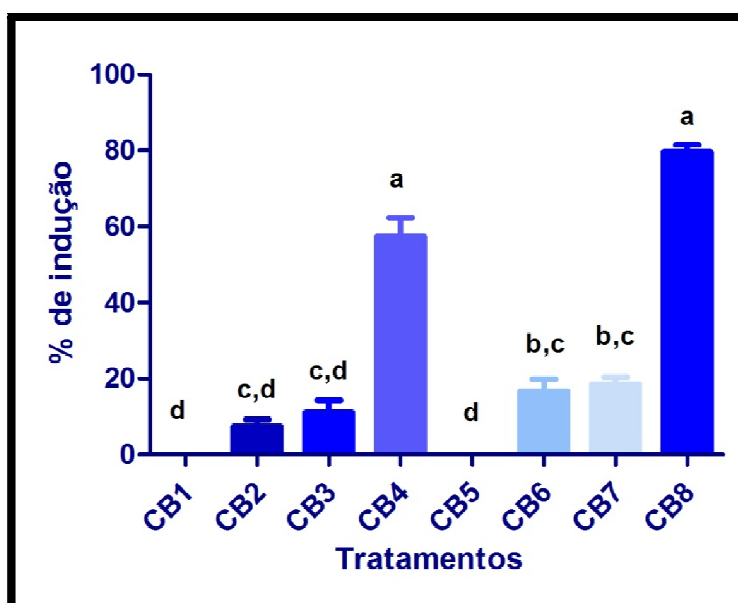


Figura 5- Efeito de diferentes meios de cultura na indução de organogênese em segmentos foliares de tamarilho vermelho. Cada barra representa a média±desvio padrão de 3 réplicas com 18 explantes por réplica. Resultados obtidos após 8 semanas de cultura. Estão ainda referenciados com a mesma letra os tratamentos que não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (teste de Tukey $P > 0,05$)

A análise periódica das culturas mostrou que o tratamento CB4 foi o que mais rapidamente (4 semanas) permitiu o desenvolvimento de gemas (Fig.6). Também o tratamento CB8 já mostrava a formação de gemas por essa altura, mas um pouco menos desenvolvidas que em CB4 (Fig. 6 e Fig. 7).

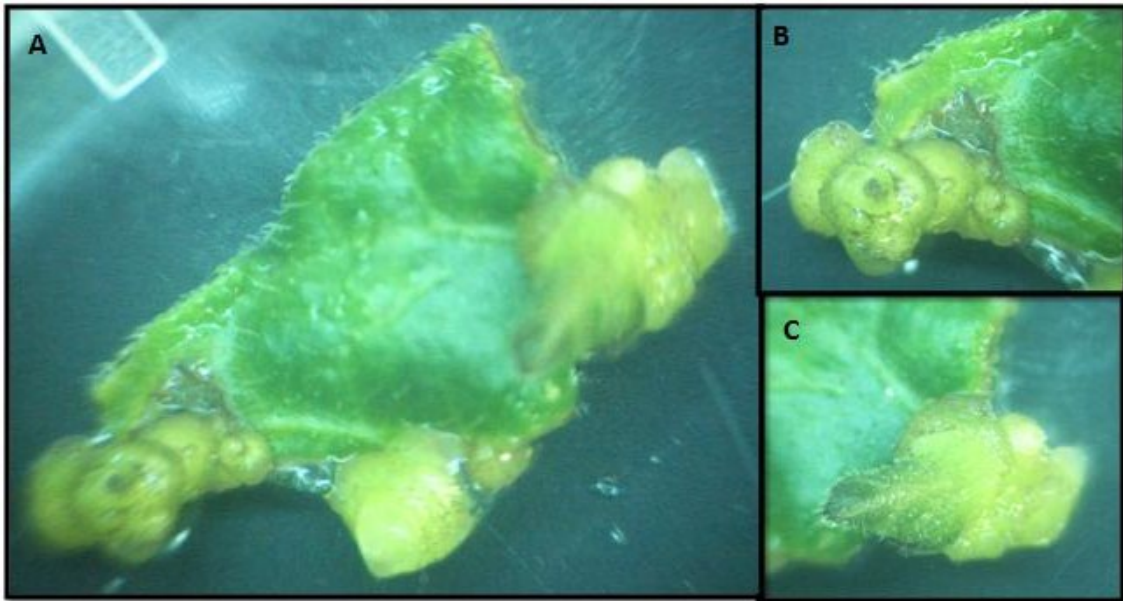


Figura 6 - Explante em meio CB4 após de 4 semanas de cultura: A. Aspeto geral das estruturas desenvolvidas; B. Pormenor das gemas; C. Fases iniciais do desenvolvimento de um rebento

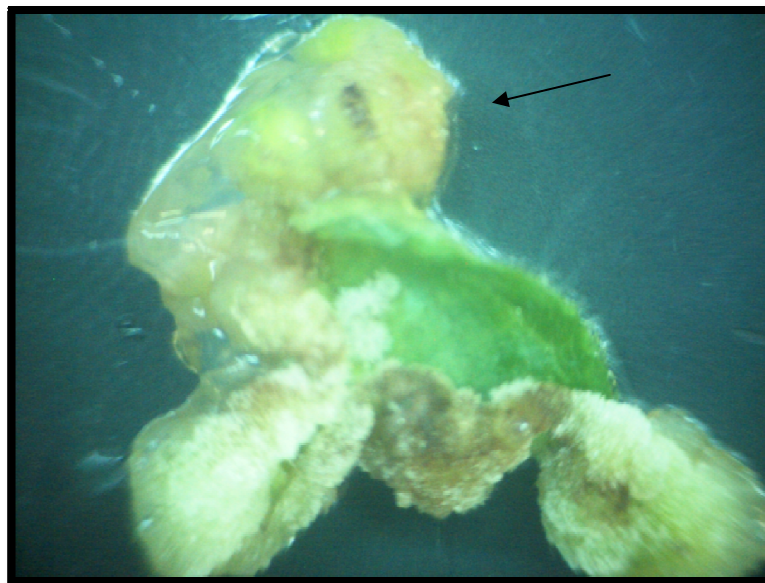


Figura 7 - Explante em meio CB8 após de 4 semanas de cultura, onde se observa o início de uma gema (Indicado com seta)

Para além da formação de rebentos caulinares, verificou-se que alguns meios induziam também a formação de raízes adventícias (Fig. 8). Essa situação ocorreu particularmente nos meios CB5, CB6 e CB7, em que as concentrações da auxina NAA estão numa razão maior ou igual quando comparadas com a citocinina BAP.

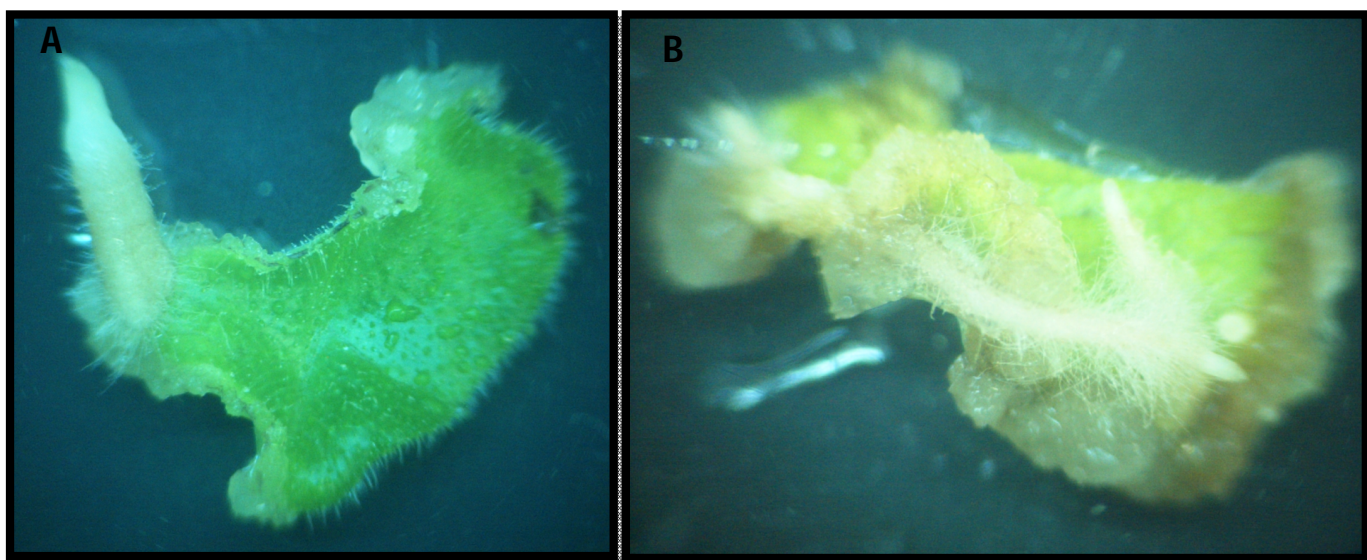


Figura 8 - Rizogénese: A. Explante em CB5 após de 2 semanas de cultura; B. Meio CB5 ao fim de 4 semanas de cultura.

Como se referiu anteriormente, elevadas concentrações de NAA demonstraram ter influência na formação de raízes e, no caso particular dos meios em que essa formação se verificou, um deles apenas continha na sua composição NAA (CB5) e em CB6 e CB7 a formação de raízes estaria associada à baixa razão entre concentrações de BAP e NAA. De fato, o papel das auxinas, na cultura de tecidos, tem sido descrito como fundamental na organização de meristemas promovendo a formação de tecido desorganizado (calo) ou órgãos definidos, geralmente raízes⁹⁰. Por outro lado, a BAP tem sido referido como a citocinina mais amplamente utilizada na indução de organogénese, quer quando aplicada isoladamente ou em associação com as auxinas NAA e IBA, estas últimas numa concentração baixa^{2,91}. No caso do uso da citocinina BAP isoladamente, tem sido referido que os meristemas adventícios se formam com

frequência a partir de calos nodulares verdes e compactos^{2,25}, como podemos verificar na figura 6, onde se usou o meio CB4. Já quando se utilizou esta citocinina conjugada com a auxina BAP, verificou-se não só o aparecimento de raízes nos meios CB5, CB6 e CB7 (Fig. 8) como também a formação de calos, que aumentou com o acréscimo da concentração de NAA quando comparada com a concentração de BAP (Fig. 9).

Ao fim de 6 semanas de cultura, já estavam formados rebentos bem desenvolvidos nos tratamentos CB2, CB3, CB4, CB6, CB7 e CB8, bem como um grande número de gemas, sendo os meios CB4 e CB8 os que apresentaram os melhores resultados, no que respeita ao número de rebentos formados, como se pode observar nas figuras 5 e 9.

Nos meios em que se usa apenas a citocinina BAP observa-se que se formam gemas a partir de nódulos verdes distribuídos pela periferia do explante, e que à medida que a concentração do referido composto aumenta também o tamanho dos nódulos aumenta, bem como a formação de rebentos. Já no caso do uso da auxina conjugada ou não a formação de calo observada ocorre praticamente ao nível de todo o explante.

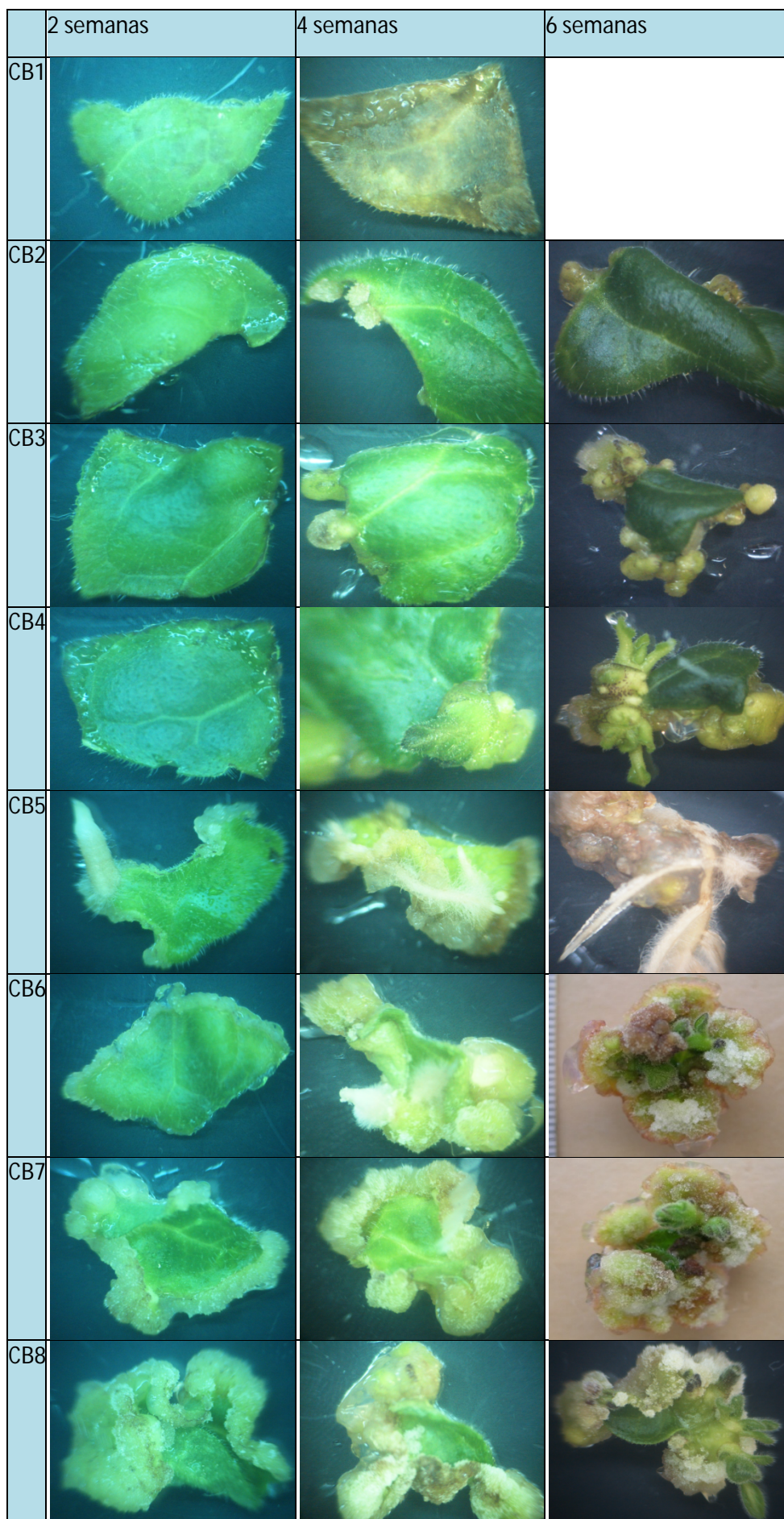


Figura 9 – Resposta dos segmentos foliares de tamarilho vermelho nos diferentes meios e após diferentes períodos de cultura

Um outro aspeto de realçar refere-se ao baixo número de rebentos formado nos meios CB6 e CB7 e, observando a figura 8, respeitante a estes meios ao fim de 6 semanas, pode verificar-se que ocorreu uma grande formação de calo em praticamente todo o explante fato que pode justificar a inibição da formação de rebentos e que já foi descrito em outras espécies^{92,93}.

O papel das auxinas e citocininas na cultura de tecidos, nomeadamente na formação de calo e raízes por parte do NAA e rebentos, por parte do BAP tem vindo a ser reportado não apenas para o tamarilho^{1,25,94}, como também noutras espécies da mesma família como a beringela⁹⁵, o tomateiro^{96,97} e na batateira^{98,99}, e em diferentes tipos de explantes.

Tendo-se verificado que o meio CB8 era o que melhores resultados produzia em termos de percentagem de indução de organogénese no tamarilho vermelho este meio foi depois testado noutras linhas de tamarilho. Os resultados relativos às diferentes linhas de tamarilho são apresentados, mais à frente, na secção 4.1.2.

4.1.1.2.2º Ensaio

Tendo-se atribuído, no ensaio anterior, um papel decisivo da auxina NAA na formação de grande quantidade de calo e raízes decidiu-se testar um novo tratamento (CB9) com uma concentração muito baixa da auxina NAA (0,5 µM) conjugado com a citocinina BAP (4,4 µM) de forma a perceber se de facto essa alteração poderia produzir melhores resultados. Testaram-se ainda novos meios em que se combinou IAA (0,25; 0,1; 0,05 e 0,01 mg/L – tratamentos CB12 a CB15 respetivamente) e BAP (na mesma concentração até então utilizada). Testou-se ainda uma citocinina, o TDZ (tratamento CB16 com concentração 0,2 µM), que demonstrou sucesso na indução de organogénese na beringela¹⁰⁰, espécie da mesma família do tamarilho, bem como em outras famílias de plantas.

Os resultados obtidos estão expressos nas figuras 10 e 12.

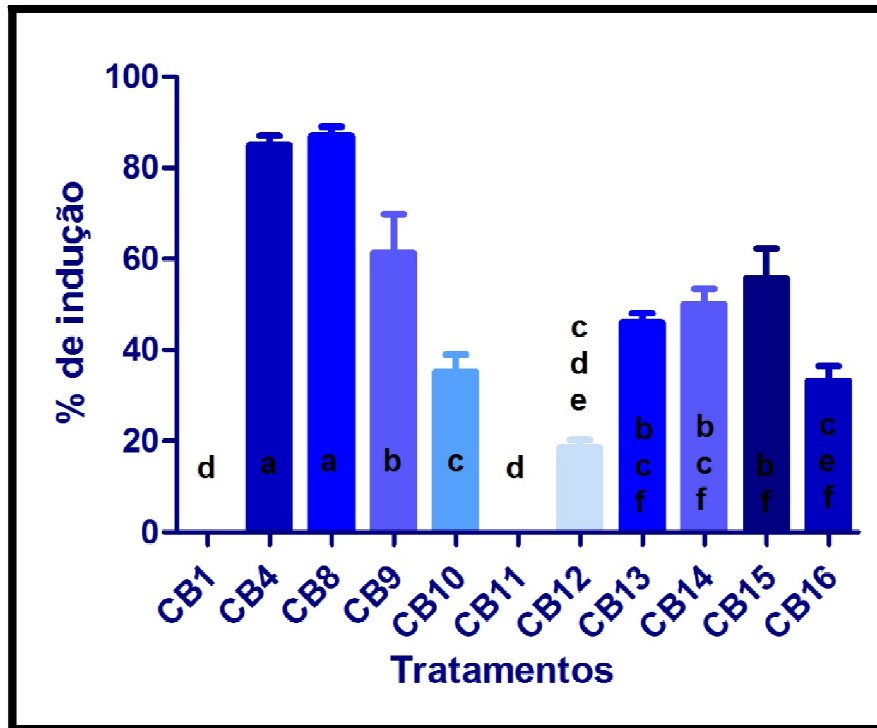


Figura 10 – Efeito de diferentes meios de cultura na indução de organogênese em segmentos foliares de tamarilho vermelho. Cada valor representa a média \pm desvio padrão de 3 réplicas com 18 explantes por réplica. Resultados obtidos após 8 semanas de cultura. Estão ainda referenciados com a mesma letra os tratamentos que não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (teste de Tukey $P > 0,05$)

Comparativamente com outros ensaios em que também se usaram os tratamentos CB4 e CB8 o número de rebentos obtidos neste ensaio foi semelhante (ver Tab. 3). Verificou-se a formação de um maior número de rebentos nos tratamentos em que se usou a citocinina BAP conjugada com IAA quando comparada com os tratamentos em que a mesma citocinina foi conjugada com a auxina NAA, exceto no tratamento CB12 onde a concentração de IAA era a mais elevada. No entanto, o maior número de rebentos formados não significa maior percentagem de indução de organogênese. Nos tratamentos com IAA o que se verificou foi a ocorrência não apenas um maior número de rebentos por explante, mas também um maior número de explantes com sinais de necrose e que não desenvolveram qualquer estrutura ou apenas calo (Fig. 11).

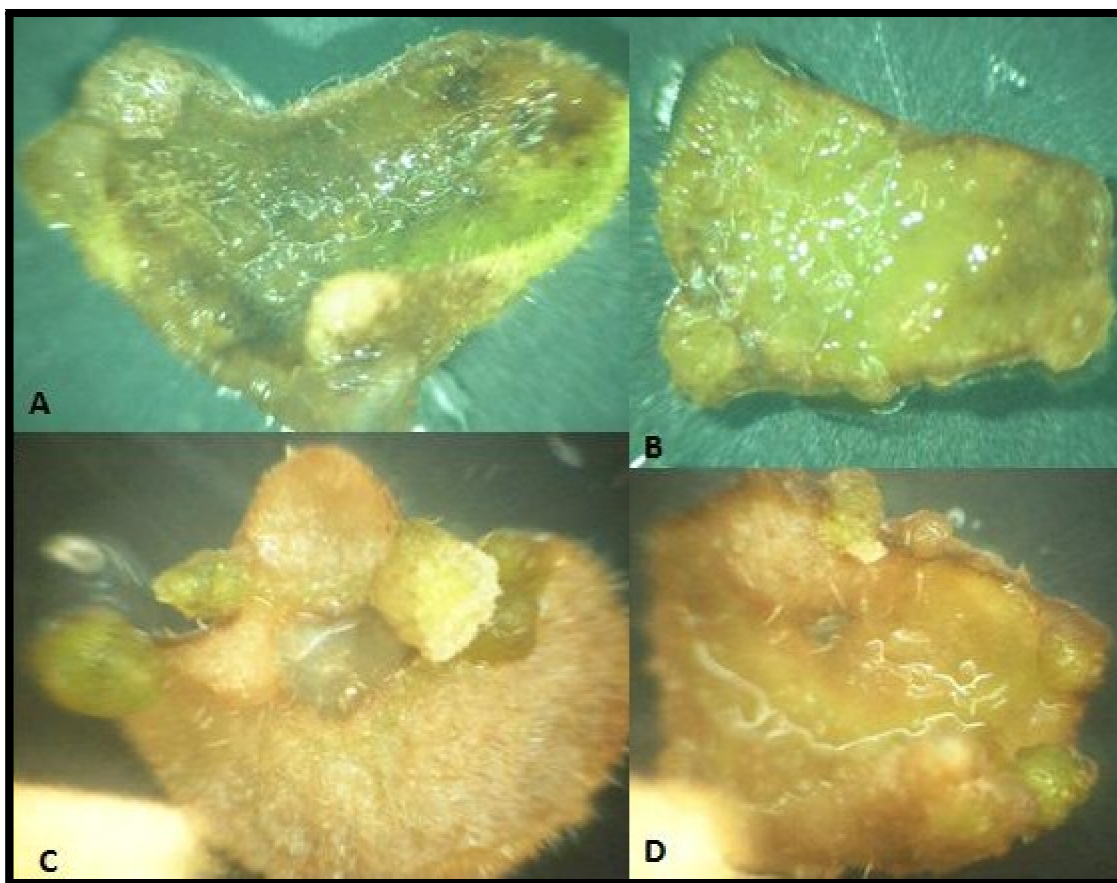


Figura 11 – Efeito do IAA na resposta dos segmentos foliares de tamarilho vermelho. A: tratamento CB13 ao fim de 4 semanas; B: tratamento CB15 ao fim de 4 semanas; C: tratamento CB13 ao fim de 6 semanas; D: tratamento CB15 ao fim de 6 semanas.

Os explantes tratados com a citocinina isoladamente e com a citocinina conjugada com NAA mostraram uma taxa de necrose muito baixa, cerca de 5% tendo-se verificando formação de rebentos em praticamente todos os explantes; os que não formam rebentos ao fim de 8 semanas apresentam gemas em início de formação as quais, se deixadas mais uma semana em cultura acabavam por desenvolver e formar um rebento. No caso dos explantes tratados com BAP e IAA observou-se que cerca de 50% dos explantes não desenvolveram gemas e rebentos mas apenas calo e acabam por entrar em necrose (Fig. 11). Num ou outro caso, observou-se a formação do início de um rebento na periferia do explante, no entanto todo o restante explante indicava necrose, não tendo o rebento desenvolvido (Fig. 12 - C e D). A figura 12 permite observar o número de rebentos formados por cada explante cultivado nos diferentes

meios, de notar o número de rebentos formados num explante tratado com as diferentes concentrações de IAA (CB12 – CB15).

Foi já referido, o papel da combinação entre BAP e NAA na composição dos meios de cultura com a finalidade de induzir formação de rebentos em tamarilho^{1,25}, bem como noutras espécies da mesma família que este^{95,96,98}. BAP e NAA são descritos como a melhor combinação para a regeneração e multiplicação de rebentos também em várias outras espécies sem proximidade filogenética com tamarilho¹⁰¹. Mas são vários os autores a descrever a formação de rebentos quer através da combinação de BAP e NAA como BAP e IAA^{2,25,101}. No entanto, também é referido, por um lado que a combinação de BAP e NAA tem um melhor efeito na indução da formação dos rebentos²⁵ e por outro lado que quando se substitui o NAA pelo IAA ocorre uma diminuição na indução da formação de rebentos, especialmente com o aumento da concentração de IAA¹⁰¹.

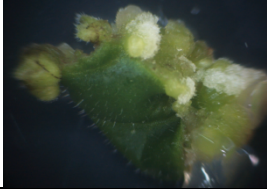
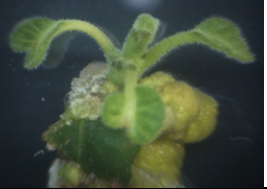

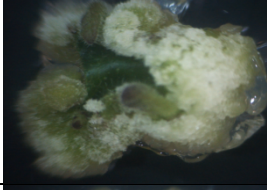


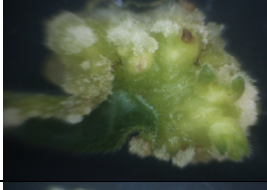
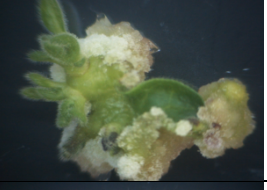

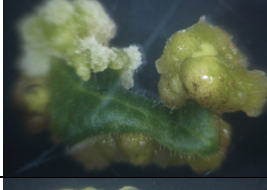
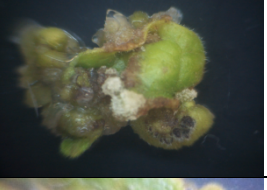

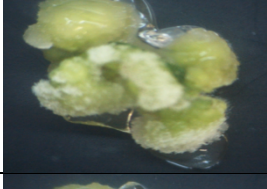
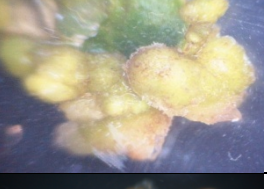

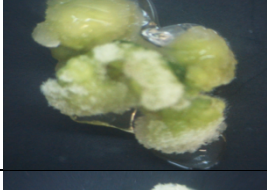
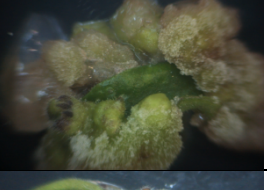


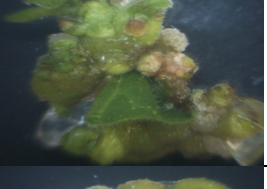

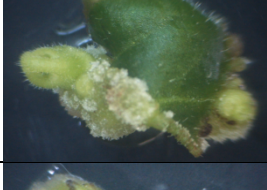
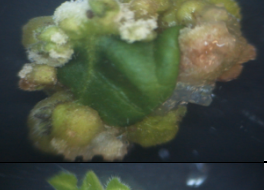


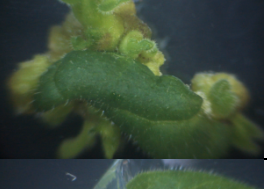

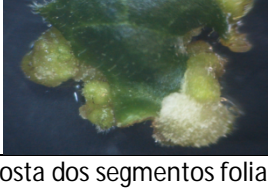


	4 SEMANAS	6 SEMANAS	Rebentos caulinares
CB4			
CB8			
CB9			
CB10			
CB11			
CB12			
CB13			
CB14			
CB15			
CB16			

Figura 12 - Resposta dos segmentos foliares de tamarilho vermelho nos diferentes meios e após diferentes períodos de cultura

A citocinina TDZ tem sido utilizada na indução de organogênese em várias espécies de plantas, quer da família Solanaceae, quer em espécies pertencentes a outras famílias. Na beringela, por exemplo, é referido que o TDZ tem uma melhor ação na indução da formação de rebentos que o BAP, quando se usam folhas ou cotilédones como explante^{100,102}. Também em espécies como a amoreira e a framboesa¹⁰³, na pereira¹⁰⁴, macieira¹⁰⁵ e no pessegueiro¹⁰⁶ entre outras, o papel do TDZ na regeneração de rebentos tem sido descrito, tendo-se revelado o seu efeito mais eficaz em espécies lenhosas¹⁰⁷.

No caso do tamarilho observou-se que o TDZ induz a formação de calos verdes, nodosos, na periferia do explante, à semelhança do que se verifica com BAP. No entanto, a formação de rebentos ocorreu apenas esporadicamente e estes aparentam com frequência um fenótipo anómalo (Fig. 12 – CB16).

4.1.1.3.3º Ensaio

Testou-se ainda a auxina o IBA isoladamente e conjugada com BAP, na indução de organogênese. Usaram-se 4 concentrações de IBA (conjugada com BAP): 0,25; 0,1; 0,05 e 0,01 mg/L respetivamente os tratamentos CB17, CB18, CB19 E CB20. No caso do uso do IBA isoladamente usaram-se as concentrações 0,01 e 0,25 mg/L (tratamentos CB21 e CB22).

O uso do IBA isoladamente revelou não ter qualquer influência na indução de organogênese visto que não se formou qualquer estrutura, tendo os explantes acabado por necrosar. (Fig.13)

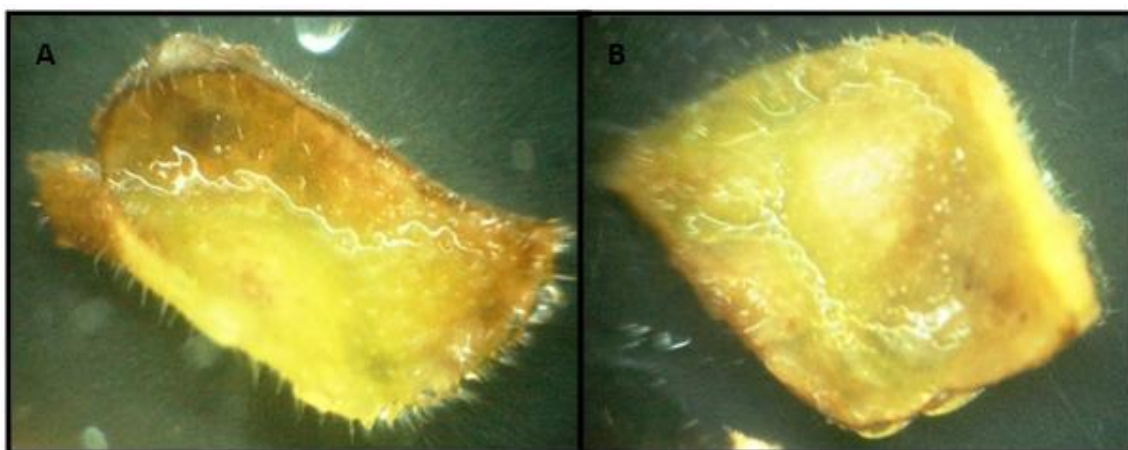


Figura 13 - Resposta dos segmentos foliares de tamarilho vermelho em duas concentrações de IBA após 8 semanas de cultura. A: tratamento CB21; B: tratamento CB22

No caso dos restantes tratamento em que foi usado IBA combinado com BAP os resultados obtidos após de 8 semanas de cultura estão expressos na figura 14.

Nos tratamentos CB18 e CB19 observou-se formação de calos em todos os explantes mas nem todos induziram rebentos, tendo sido em CB18 que se observou a maior taxa de indução de organogénese (65%). Já nos tratamentos CB17 e CB20 (respetivamente os meios com a concentração mais alta e a concentração mais baixa de IBA) a formação de calo aconteceu em cerca de metade dos explantes, mas desses explantes uma pequena taxa desenvolveu rebentos (28% e 13% respetivamente).

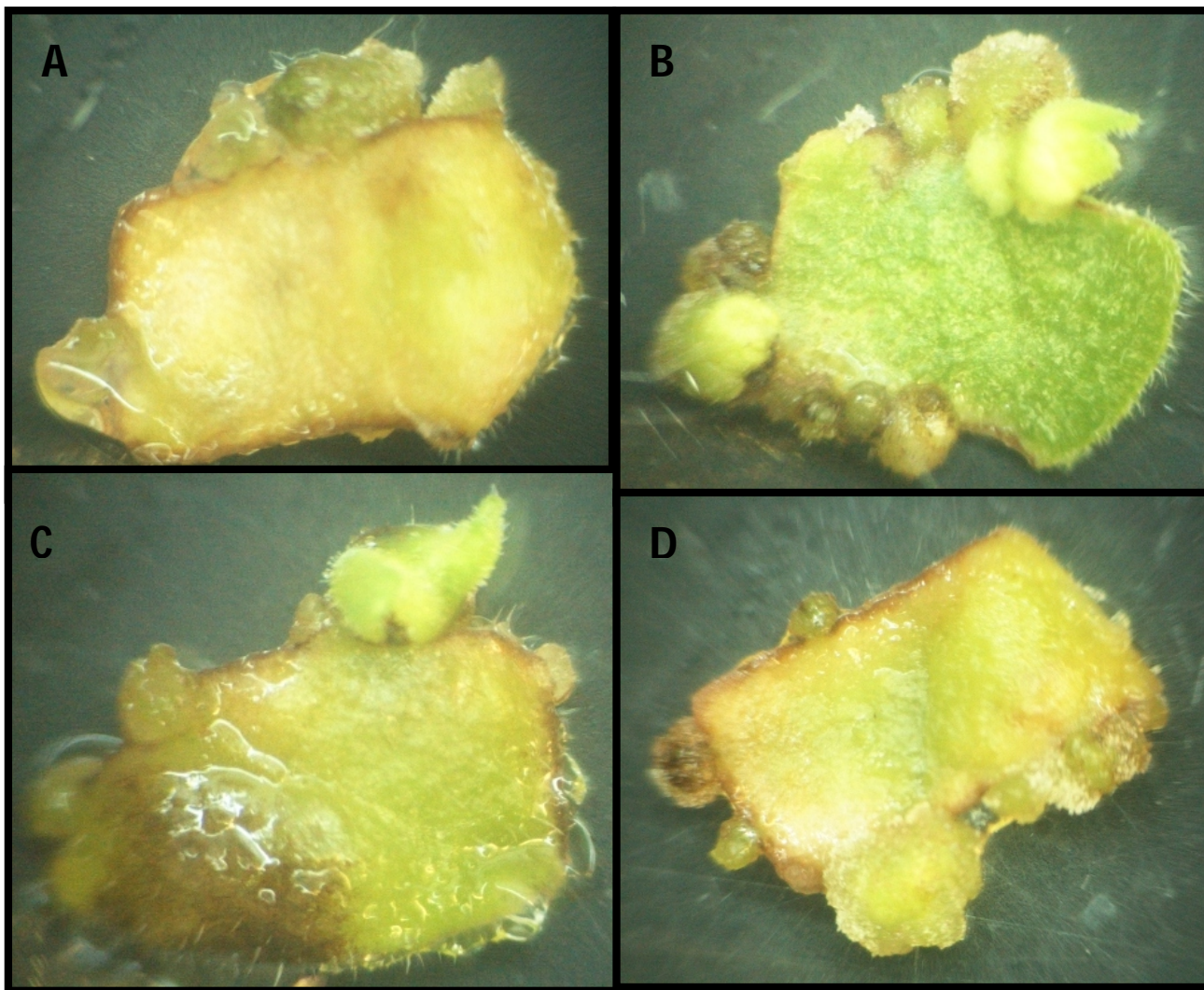


Figura 14 - Resposta dos segmentos foliares de tamarilho vermelho a 4 meios suplementados com BAP e IBA em diferentes concentrações após 8 semanas de cultura. **A:** tratamento CB17 com 0,25 mg/L de IBA; **B:** tratamento CB18 com 0,1 mg/L de IBA; **C:** tratamento CB19 com 0,25 mg/L de IBA; **D:** tratamento CB20 com 0,25 mg/L de IBA

A taxa de indução de organogénese dos tratamentos contendo diferentes concentrações de IBA está expressa na figura 15, onde se apresenta também a taxa de indução de organogénese em 2 meios controlo (CB1 – tratamento sem qualquer hormona; e CB8 – meio que melhores resultados tem apresentado ao longo do trabalho). Como se pode verificar, o tratamento CB8 é aquele que continua a apresentar melhores resultados e que se revela significativamente diferente dos outros tratamentos (80% de indução de organogénese).

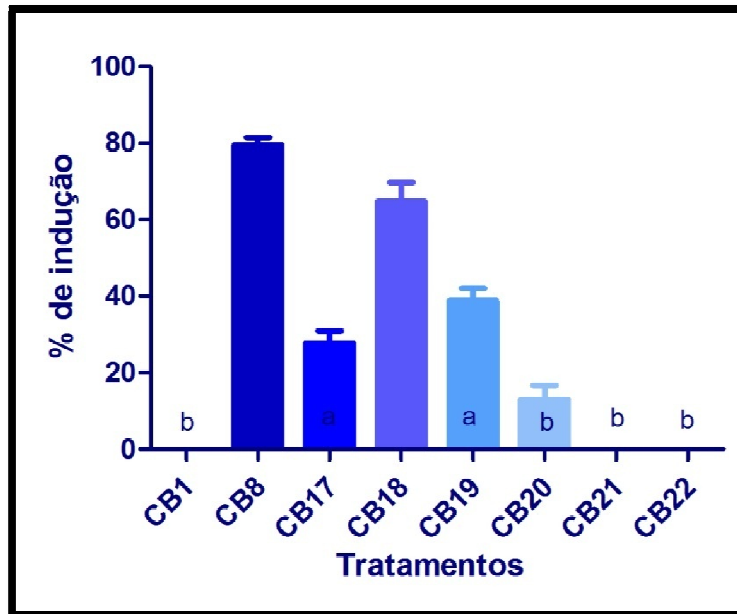


Figura 15 - Efeito de diferentes meios de cultura, contendo IBA na sua composição, na indução de organogênese em segmentos foliares de tamarilho vermelho. Cada valor representa a média \pm desvio padrão de 3 réplicas com 18 explantes por réplica. Resultados obtidos após 8 semanas de cultura. Estão ainda referenciados com a mesma letra os tratamentos que não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (teste de Tukey $P > 0,05$)

A auxina IBA tem sido usada com sucesso na indução de organogênese em algumas plantas pertencentes à família *Crassulaceae* (*Sedum aizoon*, *Sedum gracile* e *Sedum spectabile*)¹⁰⁸ e em *Jatropha curcas*^{109,110}. Em *Sclerocarya birrea* também se refere o uso de IBA na indução de organogênese, no entanto, a sua taxa de indução é menor quando comparada com combinações de BAP e NAA¹¹¹. No caso do tamarilho e em muitas outras espécies de plantas o uso do IBA é mais comumente associado à rizogênese^{101,112,113}, havendo também plantas nas quais se usa esta hormona na fase de alongamento dos rebentos^{114,115}.

4.1.1.4. Indução de organogênese em tamarilho vermelho – resumo do efeito de cada um dos reguladores de crescimento

Ao longo do trabalho a citocinina BAP demonstrou desempenhar um papel fundamental na indução da formação de rebentos em tamarilho, já que em todos os tratamentos em que esta citocinina foi utilizada, quer isoladamente quer conjugada com NAA ou IAA ocorreu a formação de rebentos. O mesmo não aconteceu quando se

utilizou a auxina NAA isoladamente e os rebentos formados em cultura com TDZ apresentavam um fenótipo anômalo.

O efeito do BAP na indução da formação de rebentos é descrito em vários trabalhos em diferentes espécies de plantas lenhosas ou não e em diversos explantes^{25,96,116}. A formação de calo verde e compacto na extremidade dos explantes, de onde posteriormente se formam os rebentos também tem sido referida em várias espécies^{1,25,111,117}.

No que respeita à auxina NAA, o seu papel tem vindo a ser descrito como fundamental na indução da formação de raízes adventícias, o mesmo não se verifica com outras auxinas^{90,101,112}. Na cultura de tecidos o NAA é muitas vezes utilizado em conjugação com BAP na indução da formação de organogénese. O seu efeito na indução de rebentos caulinares verifica-se a baixas concentrações, pois à medida que estas vão aumentando o seu efeito é mais acentuado na formação de calo¹¹², o que acaba por inibir a formação de rebentos^{92,93,118} e promover a formação de raízes^{101,112,118}. Neste trabalho, a concentração mais alta de auxina utilizada foi 0,25 mg/L tendo-se revelado ser a concentração ideal quando combinada com 1 mg/L de BAP (razão citocinina/auxina > 1). Usando concentrações mais baixas de BAP e a mesma concentração de NAA (razão citocinina/auxina < 1) a ação calogénica intensifica-se e a formação de rebentos diminuiu^{101,102}. Adicionalmente, é referido em alguns trabalhos que ao aumentar a concentração de BAP a proliferação de calo diminui¹¹⁸.

Quando se substitui o NAA por IAA, verifica-se um aumento do número de rebentos formados. No entanto, esse aumento verifica-se por explante e não na totalidade dos explantes utilizados, pois cerca de metade destes explantes não produziram qualquer estrutura acabando por entrar em necrose, tendo-se encontrado resultados semelhantes em outras espécies, considerando-se a auxina NAA melhor que o IAA neste tipo de resposta morfogénica¹⁰¹.

No que respeita ao TDZ, apesar do número elevado de espécies que demonstram bons resultados na indução de rebentos com esta citocinina^{103,104,119}, incluindo a beringela¹⁰⁰ e o tomateiro⁹⁷, espécies da mesma família do tamarilho, neste último a taxa de indução não é elevada, tendo-se constatado ainda que os rebentos formados não apresentavam um desenvolvimento normal. Por outro lado, existem também alguns trabalhos em beringela em que se usa o BAP para indução de

rebentos em explantes de folhas e o TDZ é utilizado para indução de organogénese em outros explantes como raízes e hipocótilos^{100,120}.

O efeito da hormona IBA na indução de organogénese em tamarilho não revelou resultados muito satisfatórios, apesar de esta ser utilizada com sucesso em outras plantas^{108,109,110}. No entanto, é referido para alguns casos, que apesar do IBA conjugado com a BAP induzir organogénese, a sua taxa é superior quando se combina BAP com NAA¹¹¹, o que também se verificou em tamarilho

De facto, a ação dos diferentes reguladores de crescimento tem sido demonstrada como dependente de vários fatores, entre eles, a espécie e o tipo de explante que se utiliza, verificando-se que numa mesma família de plantas um regulador de crescimento é mais eficaz num tipo de explante e numa determinada planta e noutra o efeito é diferente. A regeneração de rebentos através da técnica de organogénese tem sido descrita como dependente e afetada por diferentes fatores como a combinação de reguladores de crescimento, o tipo de explante e o genótipo^{1,112,116,120}.

Após realizar todos os ensaios referidos considerou-se que o meio que apresentou resultados mais consistentes, reprodutíveis e homogéneos foi o tratamento CB8 constituído por 1mg/L de BAP e 0,25mg/L de NAA, sendo este resultado consistente com o que havia sido encontrado na bibliografia, para esta espécie^{2,25}. Por este motivo, este foi o meio utilizado para obtenção de rebentos com vista aos ensaios de enraizamento e para os estudos histológicos.

4.1.2. Organogénese em diferentes linhas de tamarilho

Tendo-se verificado que o meio CB8 foi o mais eficaz na indução de organogénese no tamarilho vermelho este meio foi depois testado noutras linhas de tamarilho. Este ensaio demonstrou que entre as diferentes linhas as diferenças não eram substanciais, tendo-se verificado formação de calo, gemas e rebentos em todas as linhas testadas (Fig. 16).

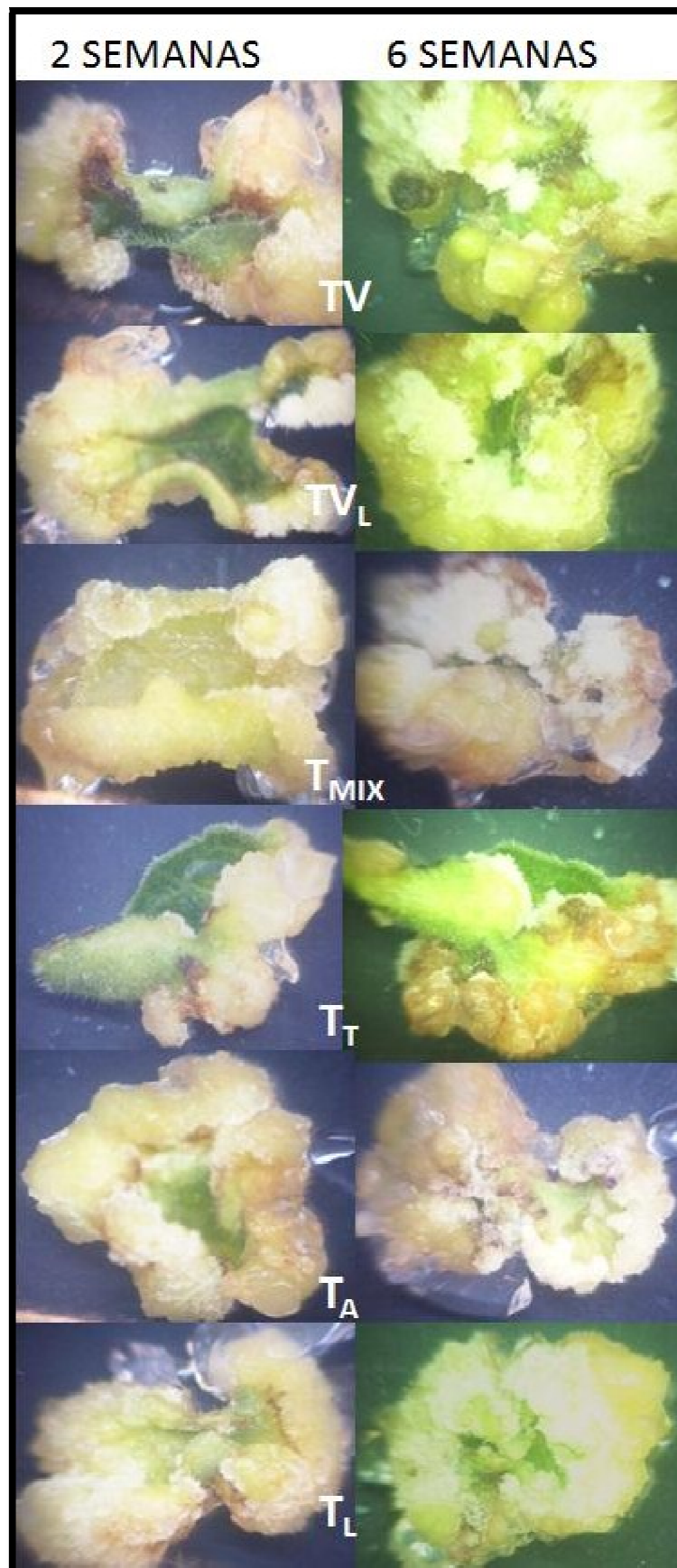


Figura 16 - Respostas dos segmentos foliares das diferentes linhas de tamarilho após diferentes tempos de cultura no tratamento CB8

Inicialmente, aparentava ser a variedade amarela de tamarilho (T_A) a que melhor respondia ao tratamento ao fim de 1 semana (Fig.17). No entanto, as respostas das diferentes linhas foram muito semelhantes (Fig. 16) obtendo-se gemas e rebentos em todas elas após 6 semanas de cultura. No entanto, no que respeita às linhas com diferentes ploidias a indução de organogénese foi menor e significativamente diferente das restantes (Fig. 18).

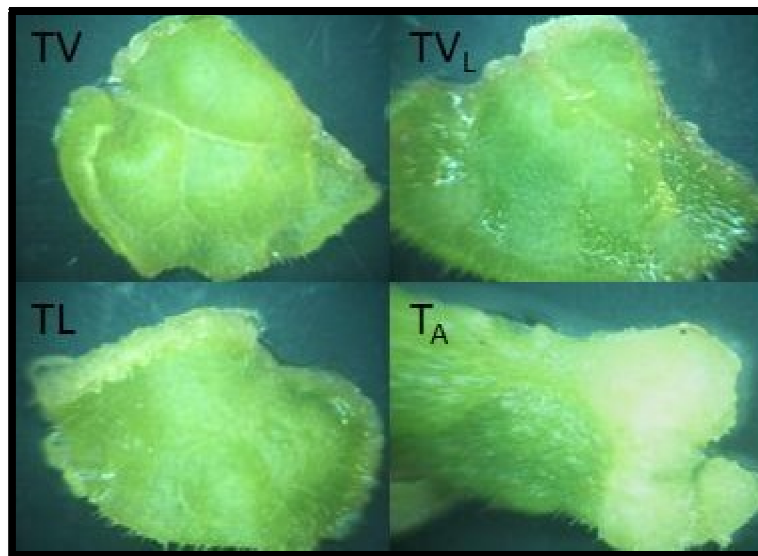


Figura 17 - Respostas dos segmentos foliares de 4 linhas de tamarilho ao fim de uma semana de cultura no tratamento CB8

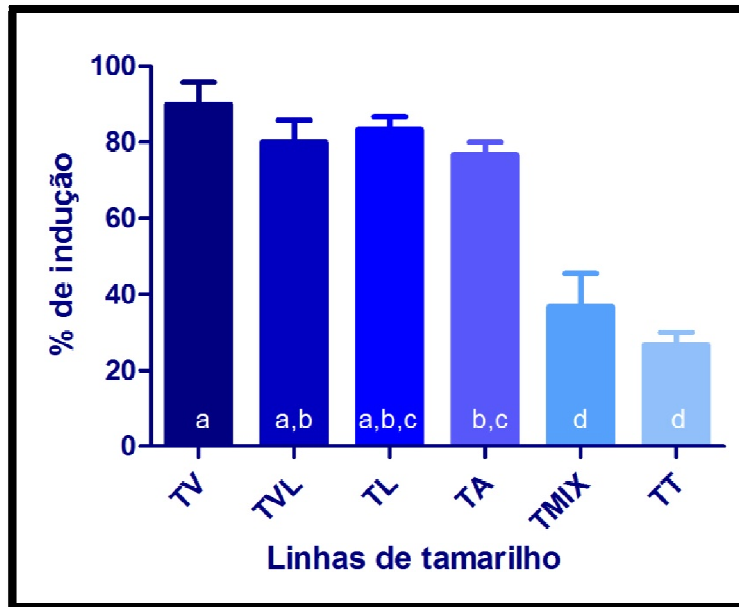


Figura 18 – Indução de organogênese em segmentos foliares de diferentes linhas de tamarilho. Cada barra representa a média±desvio padrão de 3 réplicas com 10 explantes por réplica. Resultados obtidos após 8 semanas de cultura. Estão ainda referenciados com a mesma letra os tratamentos que não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (teste de Tukey $P > 0,05$)

À semelhança dos ensaios em que se cultivou apenas o tamarilho vermelho e diferentes tratamentos e se verificava que o processo de formação de calo se iniciava na periferia do explante, nas diferentes linhas de tamarilho essa tendência também se verificou. O tratamento CB8 utilizado, não promoveu formação de raízes, como se havia já verificado nos ensaios anteriores e o número de rebentos induzido foi semelhante entre linhas (Tab. 4)

Tabela 4 – Estruturas formadas nas diferentes linhas de tamarilho estudadas

Linhas	Nº de explantes	% de resposta	Calo	Gemas/nódulos	Raízes	Média de rebentos Formados
TV	10	90%	S	S	N	9
TV _L	10	80%	S	S	N	8
TL	10	83%	S	S	N	8
TA	10	77%	S	S	N	8
T _{MIX}	10	37%	S	S	N	4
T _T	10	27%	S	S	N	3

É ainda de referir que em T_{MIX} e T_T o número de rebentos formado foi menor que nas restantes variedades, fato que pode estar relacionado com os diferentes níveis de ploidia destas linhas.

4.2. Ensaio de enraizamento

Os rebentos obtidos, com menos de 1 cm de comprimento, foram transferidos para um meio MS contendo 0,2mg/L de BAP (CB23), durante 2 – 4 semanas, de forma a estimular o seu alongamento e, posteriormente estes rebentos foram colocados em meio que potenciase o seu enraizamento. Todos os rebentos formados com pelo menos 1cm de comprimento foram isolados do explante que lhes deu origem e transferidos diretamente para meio de enraizamento. O enraizamento desses rebentos foi conseguido cultivando-os em meio MS sem hormonas (CB24) e meio MS suplementado com IBA na concentração de 1mg/L (CB25). Em ambos os tratamentos foi reduzida a quantidade de macronutrientes para metade e a sacarose para 2%.

Os resultados da exposição dos rebentos aos diferentes meios foram contabilizados ao fim de 4 semanas e estão representados na tabela 5.

Tabela 5 – Enraizamento de rebentos caulinares de tamarilho vermelho

Tratamento	Nº de raízes formadas (%)					% Total de enraizamento	Comprimento da maior raiz (média)
	0	1	2	3	+ de 3		
CB24	15%	39%	19%	15%	11%	83%	7,14 cm
CB25	11%	52%	28%	5%	4%	89%	3,23 cm

A maior percentagem de enraizamento ocorreu no meio suplementado com IBA (CB25), onde apenas 11% dos rebentos não desenvolveram raiz. Já no que respeita ao comprimento médio da raiz maior, verifica-se que foi em CB24 que se obteve o maior comprimento médio de raízes (Fig. 19 e 20).

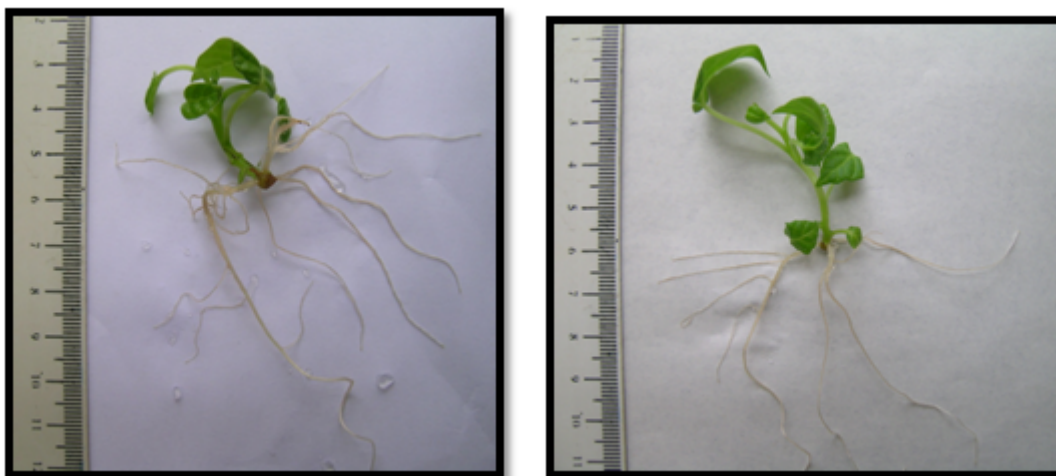


Figura 19 – Rebentos enraizados em meio MS sem hormonas (tratamento CB24)

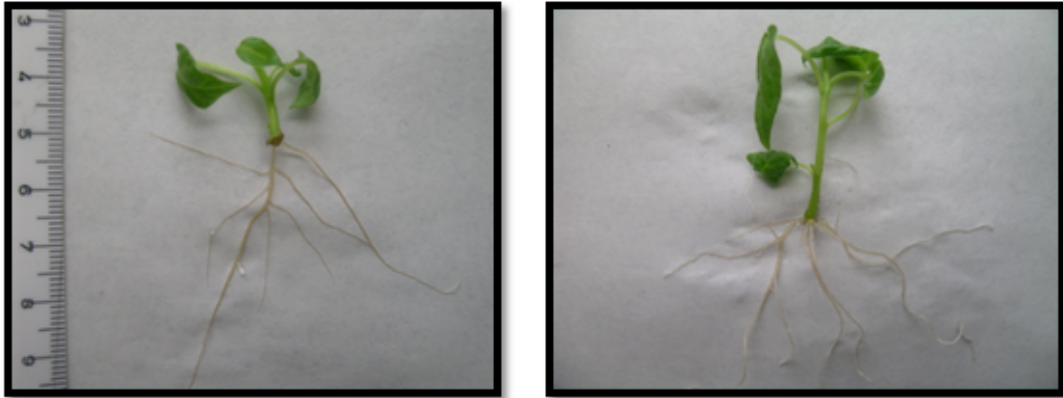


Figura 20 - Rebentos enraizados com meio MS conjugado com IBA (CB25)

Na maior parte dos rebentos, em ambos os tratamentos utilizados, formou-se apenas uma raiz, embora também se tenham obtido rebentos que não formaram qualquer raiz, ou rebentos que formaram 2, 3 ou até mais raízes, como é possível verificar nas figuras 19, 20 e 21.

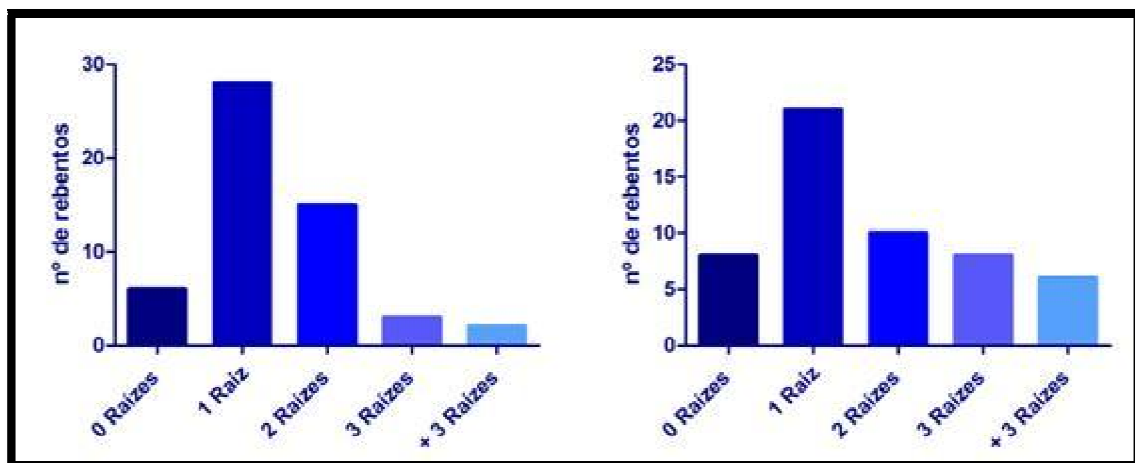


Figura 21 – Enraizamento de rebentos de tamarilho vermelho: **A**: enraizamento em IBA; **B**: enraizamento em meio sem hormonas. Cada barra representa a média±desvio padrão de 3 réplicas com 18 explantes por réplica. Resultados obtidos após 4 semanas

Os resultados obtidos demonstraram que o tratamento que não possuía hormona na sua composição originou raízes com um comprimento médio superior aos tratamentos com IBA. Analisando outros estudos conclui-se que a concentração de IBA utilizada pode ser elevada visto que, quer em tamarilho¹ como noutras espécies se tem usado também a concentração de 0,1mg/L de IBA para a indução de

enraizamento, obtendo-se bons resultados. É ainda referido que, a presença de baixas concentrações de auxinas no meio facilitam a rizogénese e que, a partir de um determinado nível ótimo, as concentrações elevadas podem inibi-la^{101,112}. Por outro lado, tem sido referido que, após a formação das raízes, a presença da auxina pode inibir o crescimento ulterior pelo que os rebentos já com raízes iniciadas devem ser transferidos para meios sem auxina de forma a promover o crescimento radicular³⁸. Ainda assim, é importante realçar a facilidade de enraizamento do tamarilho com um tratamento sem adição de hormonas. Alias, é referido para outras espécies de plantas como a soja (*Glycine max*), o melão (*Colocynthis citrullus*), a marula (*Sclerocarya birrea*) ou a *babchi* (*Psoralea corylifolia*) que o enraizamento é conseguido pela simples passagem dos rebentos do meio de indução para um meio sem adição de reguladores de crescimento^{101,112,116,121}, facto que pudemos confirmar nas repicagens de tamarilho para manutenção das suas culturas. Estas são realizadas em meio base verificando-se uma taxa de 100% de viabilidade quer da parte apical das plântulas como dos segmentos nodais, o que se revela uma vantagem económica relativamente a outras espécies em que o enraizamento não é tão simples e económico.

Após a indução de raízes nos rebentos obtidos por organogénese, estes rebentos foram transferidos para condições *ex vitro*, tendo-se verificado que todas as pequenas plântulas se desenvolveram nas seguintes condições: uma temperatura de 25°C, um fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro com intensidade de 15-20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR, sendo regadas regularmente.

Cerca de 2 - 3 meses depois, estas foram transferidas para uma outra estufa onde as condições de cultura eram mais semelhantes às condições naturais a fim de se "aclimatarem" e finalmente foram transferidas para o Jardim Botânico.

As figuras 22 e 23 testemunham várias fases do desenvolvimento de um dos rebentos proveniente da técnica de organogénese somática colocado em condições *ex vitro*.

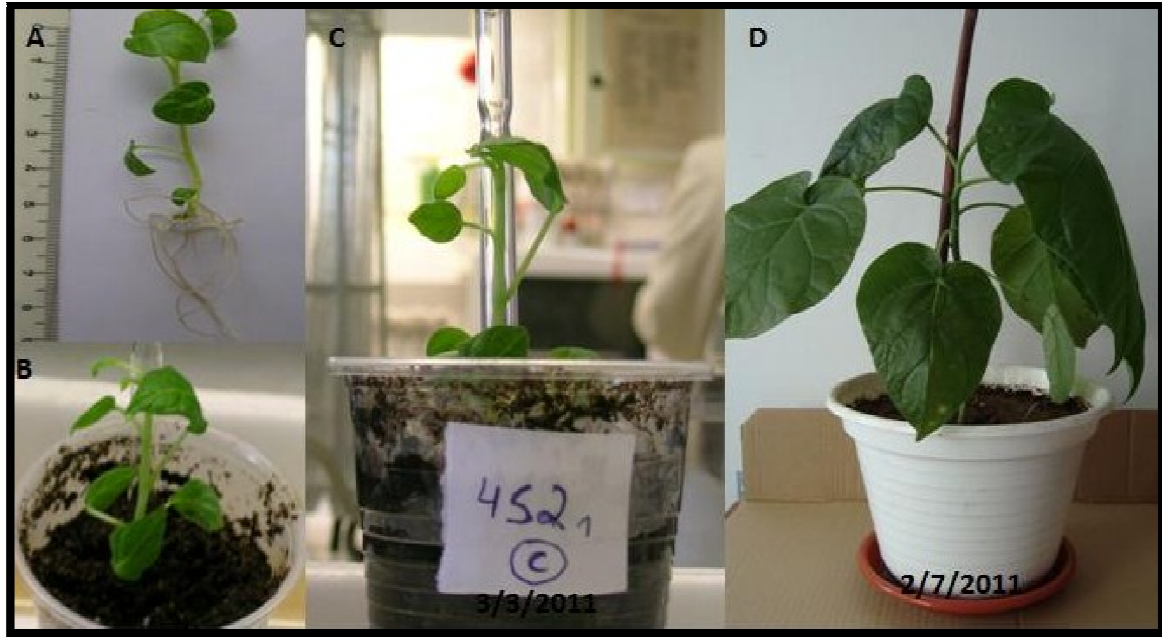


Figura 22 - Diferentes estádios da aclimação. **A:** plântula com um sistema radicular bem desenvolvido; **B-C:** plântula proveniente do 1º ensaio em terra; **D:** Planta bem desenvolvida antes da transferência para o jardim botânico.

Pode verificar-se que a plântula mostra um desenvolvimento normal, o que aconteceu com todas as plântulas colocadas *ex vitro* (Fig. 22 e Fig. 23).



Figura 23 – Tamarilho vermelho obtido por organogênese através do meio CB8. **A.** tamarilho jovem em ambiente natural à cerca de um ano (explante cultivado a 29/99/2010); **B.** Pormenor das suas flores; **C.** Pormenor do início da formação de um fruto.

4.3. Estudos histológicos da organogênese

Os estudos histológicos realizados em material fixado após diferentes intervalos de cultura no meio CB8 mostraram que as estruturas formadas a partir dos segmentos foliares eram organogénicas.

As folhas cultivadas em meio CB8 suplementado com BAP (1,0 mg/L) e NAA (0,25 mg/L) evidenciavam após uma semana de cultura, em relação a folhas não cultivadas, zonas de intensa divisão celular (Fig. 24 e 25). A histologia geral dos explantes não cultivados com meio suplementado com hormonas apresenta a epiderme superior e inferior, mesofilo assimétrico e feixes vasculares (Fig. 24).

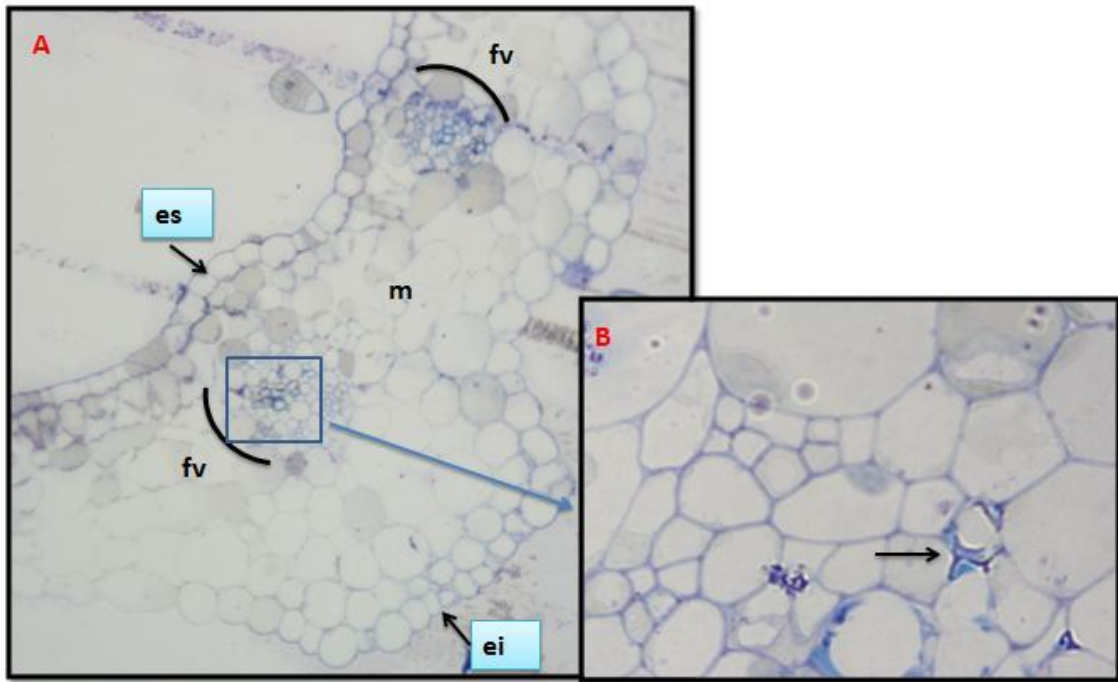


Figura 24 - Estudos histológicos em segmentos foliares de tamarilho vermelho. **A:** folha não cultivada (X10); **B:** Pormenor dos tecidos vasculares(X40). A seta indica uma célula do xilema. ei - epiderme inferior, es - epiderme superior, fv - feixe vascular, m – mesofilo

Os explantes cultivados em meio suplementado com hormonas, após uma semana de cultura já começam a evidenciar células em divisão. Estas apresentavam um núcleo volumoso e citoplasma denso (Fig. 25).

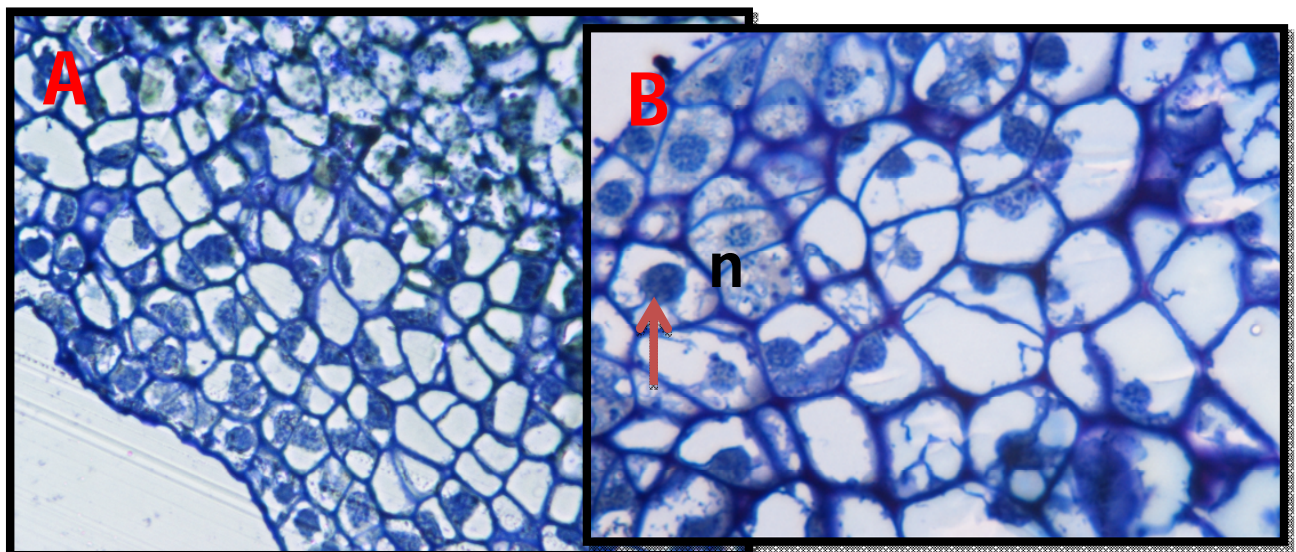


Figura 25 - Estudos histológicos em segmentos foliares de tamarilho vermelho após uma semana de cultura. **A:** Zona da folha onde é notória uma intensa proliferação celular (X10); **B:** Células das zonas de divisão, caracterizadas pela presença de núcleos volumosos (seta)(X40)
n – núcleo

Em fases mais adiantadas da cultura, observou-se a diferenciação de estruturas unipolares típicas dos processos de organogênese (Fig. 23).

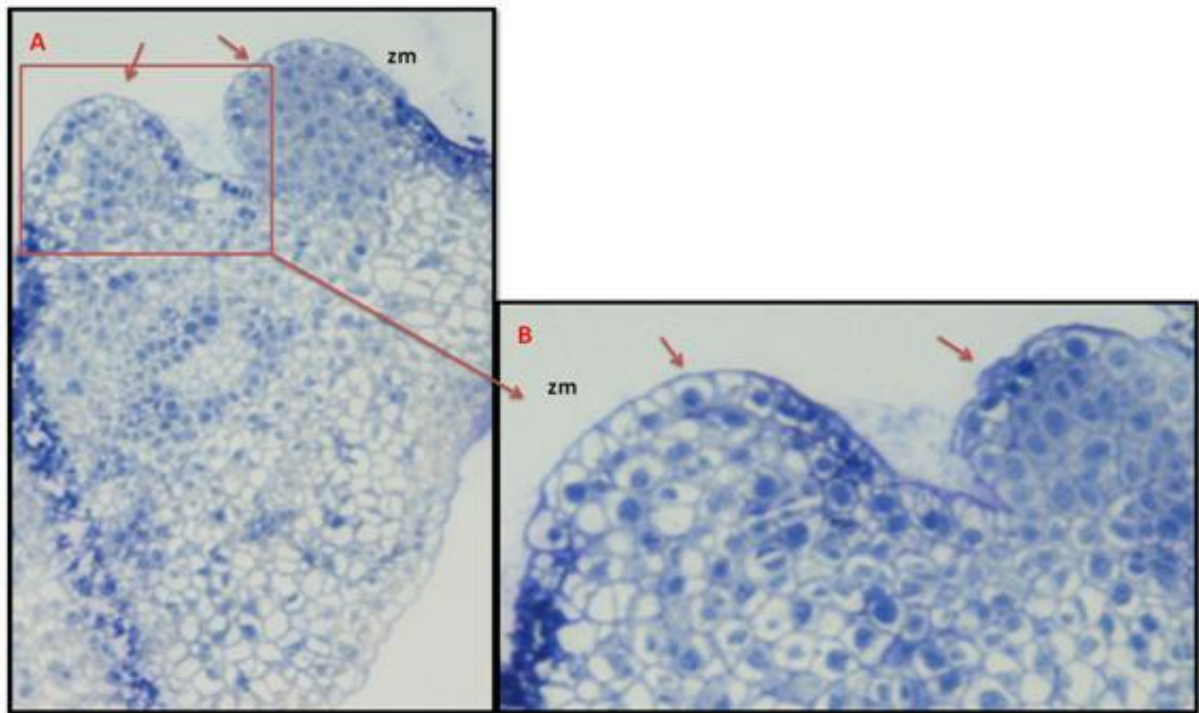
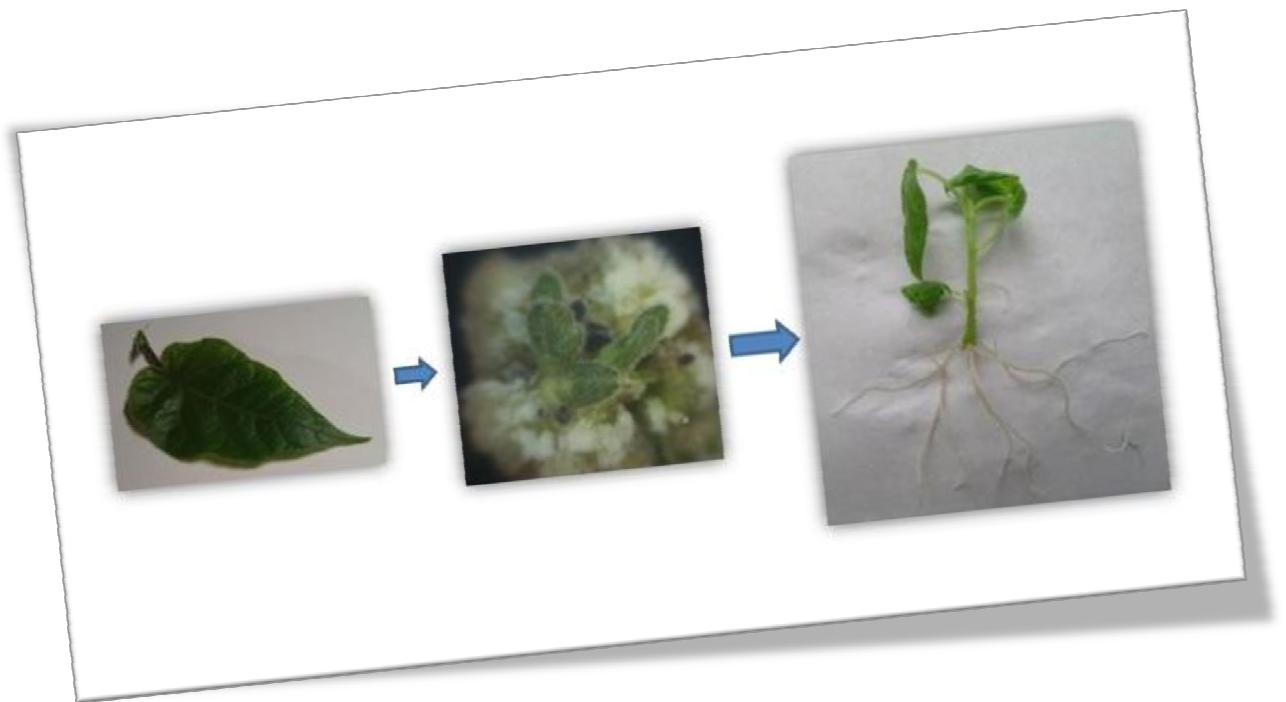


Figura 26 - Estudos histológicos em segmentos foliares de tamarilho vermelho. **A:** diferenciação das zonas meristemáticas após 3 semana de cultura (setas) (X10); **B:** Pormenor das diferentes zonas meristemáticas em diferenciação (indicado com setas) e células do tipo meristemático (X10). zm –zona meristemática



5. Conclusões

O presente estudo permitiu verificar a possibilidade de regenerar *in vitro* plantas de *Cyphomandra betacea* por organogénese.

Nos ensaios efetuados testou-se o potencial organogénico de segmentos foliares, verificando-se que estes explantes apresentavam capacidade para formar rebentos a partir dos quais se podem obter plantas, como tem vindo a ser descrito para várias famílias de plantas, incluindo diferentes espécies da família das solanáceas, como o tomateiro, a batateira e a beringela entre outras.

As diferentes respostas obtidas, consoante a exposição dos explantes aos diferentes tratamentos, demonstrou que a escolha das combinações de reguladores de crescimento é determinante para a resposta morfogénica e capacidade de regeneração.

Através dos ensaios realizados e dos resultados obtidos com este trabalho é possível verificar que a presença de BAP no meio de cultura induz a formação de rebentos, o que é corroborado por vários autores e para diferentes espécies de plantas. A resposta organogénica aumenta, na generalidade, com a concentração deste regulador de crescimento até à concentração máxima testada (1,0mg/L). Verificou-se, no entanto, tal como referido na bibliografia, que a interação entre auxinas e citocininas é um fator relevante na regulação do crescimento e do desenvolvimento de tecidos e órgãos das plantas, e que o tipo de órgão formado é controlado pelas diferentes combinações destas hormonas. Níveis elevados de auxina e baixo teor de citocinina promovem o aparecimento de raízes, enquanto que o inverso favorece a formação de gemas e rebentos.

A indução da formação de rebentos em tamarilho é favorecida pela presença da auxina NAA nos meios de cultura quando conjugada com BAP, mas não em todas as concentrações. Tal como se referiu anteriormente concentrações elevadas de NAA induzem a formação de muito *callus* tendo-se associado a não promoção de rebentos ou pelo menos a baixa produção de rebentos a esta formação. Verificou-se que a auxina IAA conjugada com a citocinina BAP induz a formação de rebentos, no entanto, após repetição deste ensaio se verifica que os resultados nem sempre são reprodutíveis. De facto, a hormona IAA induz a produção de um grande número de rebentos por explante, mas nem todos os explantes produziram rebentos, o que torna a hormona pouco consistente em termos de resposta organogénica.

Os rebentos formados, passaram por uma fase de alongamento antes de se proceder ao seu enraizamento. O meio utilizado para o dito alongamento era constituído por uma baixa concentração do regulador de crescimento BAP (0,2 mg/L), o que se justifica pelo facto de que as concentrações de citocininas utilizadas no processo de indução de rebentos se considerarem inibidoras do seu posterior desenvolvimento. Posteriormente os rebentos alongados foram transferidos para meio MS sem hormonas ou contendo IBA, tendo-se verificado que o meio sem hormonas é o mais eficaz.

A aclimação das plântulas obtidas teve sucesso, verificando-se o desenvolvimento de todo o material que, após enraizamento, foi transferido para condições *ex vitro*.

Os estudos histológicos confirmaram a origem organogénica dos explantes.

6.Referências bibliográficas

1. Guimarães, M.; Tomé, M. & Cruz, G. (1996) *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn. (Tamarillo). In Bajaj, Y. (Ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Trees IV. Berlin, Springer-Verlag. Pp. 120-137
2. California Rare Fruit Growers. Tamarillo Fruit Facts. Disponível em <http://www.cdfg.org/pubs/ff/tamarillo.html>. Consultado em 10/08/2010
3. Dawes, S. & Pringle, G. (1983) Subtropical fruit from South and Central America. In Wratt, G. et al (eds) Plant Breeding in New Zealand. Wellington, Butterworths. Pp.123-138
4. Gatita, I. & Almeida, J. (2003) Micropropagación del tomate de árbol (*Chyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn.), Solanaceae Silvestre usada en la alimentación humana. Revista Forest, 47: 9-13.
5. Asturizaga, A.; Ollgaard, B. & Balslev, H. (2006) Frutos comestibles. Botánica Económica de los Andes Centrales. Pp. 329-346.
6. Meadows, L, (2002) Growing tamarillo relatives. In: The New Zealand Home Garden. Disponível em: www.naturalhub.com. Consultado em Agosto de 2012
7. Center for Underutilised Crops (s.d.) Tree Tomato (*Cyphomandra betacea*). PAVUC Fact Sheet nº6. Disponível em: www.exoticseedsshop.com/tamarillo/Factsheet_6_Treetomato_final_3006.pdf Consultado em Agosto de 2012
8. Prohens, J. & Nuez, F. (2001) The tamarillo (*Cyphomandra betacea*): a review of a promising small fruit crop. Small Fruits Review 1: 43-68.
9. Acosta-Quezada, P.; Martínez – Laborde, J.; Vilanoca, S. & Prohens, J. (2011) morphological and Molecular Diversity in a collection of the Andean Tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.) Bulletin of university of Agricultural Sciences and Veterinary Medicare. Horticulture, 68: 500-561
10. Azurduy, S. (2009) the wild relatives of tree tomato (*Cyphomandra betacea*) in Bolivia: distribution, ecology and uses. Herbario Florestal Nacional “M. Cárdenas” (BOLV.)
11. Hume, E. & Winters, H. (1949) The “Palo de tomate” or tree tomato. Economic Botany, 3: 140-142

12. Correia, S. (2012) Somatic embryogenesis in *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt (tamarillo): optimization and molecular analysis. Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências e Tecnologia de Coimbra
13. Slack, J. (1976) Growing tamarillos. *Agricultural Gazette*, 86:2-4.
14. Symon, D. (1981) The solanaceous genera, *Browallia*, *Capsicum*, *Cestrum*, *Cyphomandra*, *Hyoscyamus*, *Lycopersicon*, *Nierembergia*, *Physalis*, *Petunia*, *Salpichroa* and *Withania*, naturalized in Australia. In: J. Adelaide. Bot. Gard. 133-166.
15. Lopes, M.; Ferreira M.; Carloto, J.; Cruz, G. & Canhoto, J. (2000) Somatic embryogenesis induction in tamarillo (*Cyphomandra betacea*). In Jain, S. et al. (Eds.). Somatic embryogenesis in woody plants. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Vol. 6: 433-455.
16. Mertz, C.; Gancel, A.; Gunata, Z.; Alter, P.; Dhuique-Mayer, C.; Vaillant, F.; Perez, A. M.; Ruales, J.; Brat, P. (2009) Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity of three tropical fruits. *J. Food Composition Analysis*, 22: 381-387.
17. Morton, J. (1982) The tree tomato, or "tamarillo", a fast-growing, early-fruited small tree for subtropical climates. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 95: 81-85.
18. Correia, S.; Lopes, M. & Canhoto, J. (2009) Somatic embryogenesis in tamarillo (*Cyphomandra betacea*): Recent advances. *Acta Horticulturae* 839: 157-164.
19. Prohens, J.; Rodriguez-Burruezo, A. & Nuez, F. (2004) Breeding Andean Solenaceae Fruit Crops for adaptations to subtropical climates. *Acta Horticultural (ISHS)*, 662: 129-127
20. Correia, S.; Lopes, M.; Canhoto, J. (2010) Biotechnology of tamarillo. In: Thangadurai, D. (Ed.), *Molecular Agrobiotechnology*. USA, Bentham Science Publishers
21. Correia, S.; Lopes, M. & Canhoto, J., 2009. Somatic embryogenesis in tamarillo (*Cyphomandra betacea*): recent advances. *Acta Horticulturae* 839: 157-164.

22. Carloto, J. 2000. Estudo de processos moleculares associados à embriogênese somática em *Cyphomandra betacea*. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular, Departamento de Botânica, Universidade de Coimbra.
23. Carloto, J.; Lopes, M.; Cruz, G.; Canhoto, J. 1999. O tamarilho. *Lavoura Moderna*, 4: 8-9.
24. Márquez, C.; Otero, C. & Cortés, M. (2007). Cambios fisiológicos, texturales, fisicoquímicos y microestructurales del tomate del árbol (*Chyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn.) en poscosecha. *Vitae, Revista de la facultad de química farmacêutica*, 14: 9-16.
25. Atkinson, R. & Gardner, R. (1993) Regeneration of transgenic tamarillo plants. *Plant Cell Rep.*, 12: 347-351.
26. Stephens, J. (1994) Tomato, Tree – *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. Disponível em: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/edis/MV/MV14600.pdf>. Consultado em Agosto de 2011
27. Canhoto, J.; Lopes, M. & Cruz, G. (2005) Protocol of somatic embryogenesis: Tamarillo (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn.). In: Jain, S. & Gupta, P. (eds.) Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. Netherlands, Springer, pp. 379-389.
28. Mertz, C.; Brot, P.; Caris Veryrat; C. & Gunata, Z. (2010) Characterization and thermal lability of carotenoids and vitamin C of Tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). *Food Chemistry*, 119: 653-659
29. Ordóñez, R.; Cardozo, M.; Zampini, I. & Isla, M. (2010) Evaluation of Antioxidant Activity and Genotoxicity of Alcoholic and Aqueous Beverages and Pomace Derived from Ripe Fruits of *Cyphomandra betacea* Sendt. *J. Agric. Food Chem*, 58 (1): 331–337
30. McCane, J. & Widdowson, D. (1992) In: Fruit and nut (Suppl. To the composition of foods.) 5th Ed. London, Holland, Unwin & Buss, pp. 74-77.
31. Tavares, V.; Andrade, L. & Echeverrigaray, S. (2007) Quebra de Dormência de Sementes e Cultivo *in vitro* de *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. *Revista Brasileira de Biociências*, 5: 1161-1163
32. Bobbio, F.; Bobbio, P. & Rodriguez, A. (1983) Anthocyanins of the brazilian fruit *Cyphomandra betacea*. *Food Chemistry*, 12: 189-195.

33. Márquez, C.; Otero, C. & Cortés, M. (2007) Cambios fisiológicos, texturales, fisicoquímicos y microestructurales del tomate del árbol (*Chyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn.) en poscosecha. *Vitae, Revista de la facultad de química farmacêutica*, 14: 9-16.
34. Kou M.; Yen, J.; Hong, J.; Wang, C.; Lin, C. & Wu, M. (2009). *Cyphomandra betacea* Sendt. Phenolics protect LDL from *oxidation and PC12 cells from oxidative stress. Food Science and Technology*, 42: 458-463.
35. De Rosso, V. & Mercadante, A. (2007) HPLC-PDA-MS/MS of anthocyanins and carotenoids from dovyalis and tamarillo fruits. *J Agric Food Chem* 55: 9135- 9141.
36. Hurtado, N.; Morales, A.; González-Miret, M.; Escudero-Gilete, M. & Heredia, F. (2009) Color, pH stability and antioxidant activity of anthocyanin rutinosides isolated from tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). *Food Chem* 117: 88-93.
37. Roldão, I. Alpuim, M. & bohm, J. (1992) Considerações sobre os resultados já obtidos na propagação vegetativa do sobreiro. *Sientia gerundensis*, 18: 85-89
38. Canhoto, J. (2010) *Biotecnologia Vegetal da Clonagem de Plantas à Transformação Genética*. Imprensa da Universidade de Coimbra. Coimbra
39. Hartmann, H. & Kester, D.(1967) *Propagacion de plantas*. 3° ed. Cidade do México: Copañía Editorial Continental S.A.
40. Thorpe, T.; Harry, I. & Kumar, P. (1991) Applications of micropropagation to forestry. In: P. Debergh & R. Zimmerman (Editores), *Micropropagation*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 311-336
41. Alvarez, C. & Restrepo, L. (1998) Propagacion "in vitro" de *Eucaliptus grandis*. *Cronica florestal y de medio ambiente*, 8: 35-42
42. George, E. & Sherrigton, P.(1984) *Plant propagation by tissue culture*. London, Great Britain: Eastem Press.
43. Grattapaglia, D., & Machado, M. (1990) Micropropagação. In: Torres, A. & Caldas, L. (Editores) *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília. ABCTP EMBRAPA-CNPH. Pp. 99-169.

44. Georg, E. (2008) Plant Propagation by Tissue Culture. Volume 1: The Background. 3rd Edition. Springer, Netherlands.
45. Neumann, K. & Imani, A. (2009) Plant Cell and Tissue Culture – A Tool in Biotechnology. Basics and Application. Springer, Germany.
46. Georg, E. (1993) Propagation by Tissue Culture. Part I: The Technology. 1st Edition. Exergetics Limited, England.
47. Grattapaglia, D., & Machado, M. (1998) Micropropagação. In: A. Torres & L. Caldas (Editores) Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília. EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ. Volume 1. Pp: 183-260
48. Chawla, H. (2009) Introduction to Plant Biotechnology. 3rd Edition. Science Publishers, USA.
49. Vasil, I. (1987) Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereal and grape crops. *Journal of Plant Physiology*, 128: 193-218
50. Jha, T. & Ghosh, B. (2005) Plant Tissue Culture. Basic and Applied. Universities Press, India.
51. Kane, M. (2005) Shoot Culture Procedures. In: R. Trigiano & D. Gray (Editores) Plant Development and Biotechnology. CRC Press. Boca Raton. Pp. 145-158
52. Murashige, T. (1974) Plant Propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25: 135-166
53. Schwarz, O. Sharma, A. & Beaty, R. (2004) Propagation from nonmeristematic tissues: organogenesis. In: R. Trigiano & D. Gray (Editores) Plant Development and Biotechnology. CRC Press. Boca Raton.
54. Flick, C.; Evans, D.; & Sharp, W. (1983) Organogenesis. In D. Evans et al (editors) Handbook of Plant Cell Culture, vol 1. Techniques for Propagation and Breeding. Macmillan Pubis. Comp., Ney York, pp. 13-81
55. D'Amato, F. (1991) Nuclear Changes in cultured plant cells. *Caryologia*, 44: 217-224
56. Deverno, L. (1995) An evaluation of somaclonal variation during somatic embryogenesis. In: S. Jain; P. Gupta & R. Newton (editors), Somatic Embryogenesis in woody plants. Vol. 1, pp. 361-378

57. Rice, R.; Alderson, P.; Hall, J. & Ranhhod, A. (1992) Micropropagation: principles and commercial practice. In: M. Fowler et al (Editors), Plant Biotechnology. Pergamon Press, Oxford, pp. 128-149
58. Brown, D. & Thorpe, T. (1986) Plant Regeneration by Organogenesis. In: I. Vasil (Editor), Cell Culture e Somatic Cell Genetics of Plants, vol. 3. Plant Regeneration and Genetic Variability. Academic Press, Orlando, pp. 49-65
59. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497
60. Chandler, S. & Thorpe, T. (1986) Hormonal regulation of organogenesis in vitro. In: S. Purohit (Editor), Hormonal Regulation of Plant Growth and Development, Vol.3. Agro Botanical Publis., India, pp. 1-27
61. Tisserat, B. (1985) Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. In: R. Dixon (Editor), Plant Cell Culture, A Pratical Approach. IRL Press, Oxford, pp. 79-105
62. Bao, Y.; Dharmawardhana, P.; Mockler, T. & Strauss, H. (2009) Genome scale transcriptome analysis of shoot organogenesis in *Populus*. *BMC Biology* 9:132.
63. Hu, C. & Wang, P. (1983) Meristem, shoot tip and bud culture. In: D. Evans et al (editors). Handbook of Plant Cell Culture. Vol.1. Techniques for propagation and breeding. Macmillan Publishing Company, New York, pp. 177-227.
64. Thorpe, T. (1995) *In Vitro* Embryogenesis in Plants. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. Volume 20. Kluwer Academic Publishers. Netherlands
65. Teale, W.; Paponov, I. & Palme, K. (2006) Auxin in action: signaling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Rewiews – Molecular Cell Biology* 7: 847-859
66. Davies, P. (2004) Plant Hormones – Biosynthesis, Signal, Transduction, Action! Kluwer Academic Publishers. Londres
67. Bari, R. & Jones, J. (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology* 69: 473-488

68. Santner, A. & Estelle, M. (2009) Recent advances and emerging trends in plant hormone signaling. *Nature Reviews* 459: 1071-1078
69. Santner, A.; Calderon-villalobos, L. & Estelle, M. (2009) Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chemical Biology* 5: 301 - 307
70. Vanneste, S. & Friml, J. (2009) Auxin: A Trigger for Change in Plant Development. *Cell* 136: 1005-1016
71. Zhao, Y. (2010) Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu Rev Plant Biol.* 61: 49–64
72. Mockaitis, K. & Estelle, M. (2008) Auxin Receptors and Plant Development: A New Signaling Paradigm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 24: 55–80
73. Fakharai, H. & Fakharai F. (1990) Hormonal Control of Growth and Development. In W. Pollard & J. Walter (Editores) *Plant Cell and Tissue Culture*. The Humana Press. Pp. 49-50
74. Raven, P., Evert, R., & Eichhornt, S. (2001) *Biologia Vegetal*. 6 ed. Rio de Janeiro. Guanabara koogan. pp. 649-667
75. Gaspar, T.; Kevers, C.; Penel, C.; Greppin, H.; Reid, D. & Thorpe, T. (1996) Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 32: 272-289
76. Evans, E.; Coleman, J. & Kearns, A. (2003) *Plant cell Culture*. BIOS Scientific Publishers, Oxford. Pp 1-15
77. Paranhos, A. (2005) Cultura de células e tecidos vegetais *in vitro*: uma fonte alternativa de metabolitos secundários. *In*: Proença-da-Cunha, A. (Ed.), *Farmacognosia e Fitoquímica*. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, pp. 65-88.
78. Cohen, D. & Elliot, D. (1979) Micropropagation methods for blueberries and tamarillos. *Comb Proc Int Plant Prop Soc* 29: 177-179.
79. Barghchi, M. (1986) *In vitro* rejuvenation of *Cyphomandra betacea* (tamarillo). *Plant Physiology Division Biennial Report, Department of Scientific and Industrial Research (DSIR), New Zealand*, pp. 52
80. Barghchi, M. (1998) *In vitro* regeneration, plant improvement and virus elimination of tamarillo [*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt]. *In*: M. Davey,

- P. Alderson, K. Lowe, J. Power (Editores.) Tree Biotechnology – Towards the Millennium. Nottingham, Nottingham University Press, pp. 173-185.
81. Obando, M.; Goreux, A. & Jordan, M. (1992) Regeneration *in vitro* de *Cyphomandra betacea* (tamarillo), una especie frutal andina. Ciencia e Investigacion Agraria 19: 125-130.
 82. Obando, M. & Jordan, M. (2001) Regenerative responses of *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (tamarillo) cultivated *in vitro*. Acta Hort 560: 429-432.
 83. Guimarães, M.; Cruz, G. & Montezuma-de-Carvalho, J. (1988) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. Plant Cell Tiss Org Cult 15: 161-167.
 84. Correia, S.; Lopes, M. & Canhoto, J. (2011) Somatic embryogenesis induction system for cloning an adult *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (tamarillo). Trees, 25: 1009-1020
 85. Correia, S.; Cunha, A.; Salgueiro, L. e Canhoto, J. (2012) Somatic Embriogenesis in tamarillo (*Cyphomandra betacea*): approaches to increase efficiency of embryo formation and plant development. Plant Cell Tiss Organ Cult 109: 143-152
 86. Tomé, M.; Guimarães, M. & Cruz, G. (1992) Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. Abstr 1st Congresso Hispano-Luso de Biotecnologia, Santiago de Compostela, Spain.
 87. Cohen, D.; Van Den Brink, R.; MacDiarmid, R.; Beck, D. & Forster, R. (2000) Resistance to tamarillo mosaic virus in transgenic tamarillos and expression of the transgenes in F1 progeny. Acta Hort 521: 43-49
 88. Cruz, F. & Tomé, M. (2007) *Agrobacterium*-mediated transformation of tamarillo plants. Proc of Plant Transformation Technology, Vienna, Austria.
 89. Atkinson, R.; Eagles, R. & Forster, R. (Genetic Transformation of *Cyphomandra betacea* (Tamarillo) (1984) In: Y. Bajaj (Editor) Biotechnology in agriculture and Forestry. Volume 29. Plant protoplasts and genetic engeneering V. Springer. Berlin Heidelberg. New York. Pp. 275-288
 90. Gaspar, T.; Kevers, C.; Penel, C.; Greppin, H.; Reid, D. & Torphe, T. (1996) Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. In Vitro Cell Dev. Biol. 32: 271 – 289

91. Mousavi, E.; Behbahani, M.; Hadavi, E. & Miri, S. (2012) Callus Indution and plant regeneration in Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*). Trakia Journal of Sciences. 10: 22-25
92. Mantovani, N.; Franco, E. & Vestena, S. (2001) *In vitro* regeneration of Louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel). Ciência Florestal 11: 93-101
93. Dal Vesco, L. & Guerra, M. (1999) Organogénese e micropropagação de goiabeira serrana. Rev. Bras. De Frutic. 21: 60-64
94. Guimarães, M.; Rebelo, M. & Cruz, G. (1991) Influencia de diferentes reguladores de crescimento na nodulação da resposta morfogénica de embriões zigóticos de *Chyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. cultivados *in vitro*. Abstr XXVI Jornadas Luso-Espanholas de Genética, Coimbra, Portugal. Pp.195
95. Sarker, R.; Yesmin, S. & Hoque, M. (2006) Multiple shot formation in eggplant (*Solanum melongena* L.) Plant Tissue Cult. & Biotech. 16: 53 -61
96. Mohamed, A.; Ismail, M. & Rahman, M. (2012) *In vitro* response from cotyledon and hypocotyls explants in tomato by inducing 6-benzylaminopurine. African Journal of Biotechnology 9: 4802 – 4807
97. Osman, M.; Elhadi, E. & Khalafalla, M. (2012) Callus formation and organogenesis of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill, C.V. Omdurman) induced by thidiazuron. African Journal of Biotechnology 9: 4407 – 4413
98. Anjum, M. & Ali, H. (2004) Effect of culture medium on direct organogenesis from different explants of various potato genotypes. Biotechnology 3: 187 - 193
99. Esna-Ashari, & Villiers, T. (1998) Plant Regeneration from tuber discs of potato (*Solanum tuberosum* L.) using 6-benzylaminopurine (BAP). Potato Research 41: 371 – 382
100. Magioli, C.; Rocha, A. & Oliveira, D. (1998) Efficient shot organogenesis of eggplant (*Solanum menongena* L.) induced by thidiazuron. Plant Cell Reports 17: 661 – 663

101. Anis, M. & Faisal, M. (2005) In vitro regeneration and mass multiplication of *Psoralea corylifolia* – an endangered medicinal plant. *Indian Journal of Biotechnology* 4: 261 – 264
102. Choudhary, A.; Ray, A.; Jha, S. & Mishra, S. (2011) Callus formation, shoot initiation and *in vitro* culture of *Aloe vera*. *Biotechnol. Bioinf. Bioeng.*4: 551-553
103. Fiola, A.; Hassan, M.; Swartz, H.; Bors, R. & McNicols, R. (1990) Adventitious shoot regeneration from in vitro-cultured leaves of *Rubus* genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 20: 223-228
104. Singha, S. & Bhatia, S. (1988) Shoot proliferation of pear cultures on medium containing thidiazuron and benzylamino purine. *HortScience*. 26: 749 (Abstr.)
105. Van-Nieuwkerk, J; Zimmermen, R. & Fordham, R. (1986) Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation in vitro. *HortScience* 21: 516-518
106. Zimmermen, T. & Scorza, R. (1992) Shoot growth and proliferation of peach under varying environmental regimes. *HortScience* 27: 696 (Abstr.)
107. Huetteman, C. & Preece, J. (1993) Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tissue and Organ culture* 33: 105 -119
108. Wojciechowicz, M. (2011) Organogenesis and somatic embryogenesis induced in petal cultures of *Sedum* species. *African Journal of Biotechnology* 10(54): 11249-11258
109. Nogueira, A.; Soares, A. Ibrahim, A. & Campos, F. (2011) Analysis of organogenic competence of cotyledons of *Jatropha curcas* and their *in vitro* histological behavior. *African Journal of Biotechnology* 10(54): 11249-11258
110. Mukherjee, P.; Varshney, A.; Johnson, T. & Jha, T. (2011) *Jatropha curcas*: a review on biotechnological status and challenges. *Plant Biotechnol Rep* 5:197–215
111. Moyom, M.; Finnie, J. & Staden, J. (2009) *In vitro* morphogenesis of organogenic nodules derived from *Scleorocarya birrea* subsp. *Caffra* leaf explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 98: 273 – 280

112. Moyom, M.; Finnie, J. & Staden, J. (2011) Recalcitrant effects associated with the development of basal callus-like tissue on caulogenesis and rhizogenesis in *Sclerocarya birrea*. *Plant Growth Regul* 63: 187 – 195
113. Drew, R.; McComb, J. & Considine, J. (1993) Rhizogenesis and root growth of *Carica papaya* L. *in vitro* in relation to auxin sensitive phases and use of riboflavin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33: 1-7
114. Kumar, N. & Reddy, M. (2010) Plant regeneration through the direct induction of shoot buds from petiole explants of *Jatropha curcas*: a biofuel plant. *Annals of Applied Biology* 156: 367–375
115. Panghal, S.; Beniwal, V. & Laura, J. (2012) An efficient plant regeneration protocol from petiole explants of physic nut (*Jatropha curcas* L.) *African Journal of Biotechnology* 11(63): 12652-12656
116. Ntui, V.; Thirukkumaran, G.; Iloka, S. & Mii, M. (2009) Efficient plant regeneration via organogenesis in “Egusi” melon (*Colocynthis citrulus* L.) *Scientia Horticulturae* 119: 397 – 402
117. Sujatha, M.; Makkar, H. & Becker, K. (2005) Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non-toxic *Jatropha curcas* L.. *Plant Growth Regulation* 47: 83 -90
118. Mezzetti, B.; Savini, G.; Carnevali, F. & Mott, D. (1996) Plant genotype and growth regulators interaction affecting *in vitro* morphogenesis of blackberry and raspberry. *Biologia Plantarum* 39: 139 – 150
119. Landi, L. & Mezzetti, B. (2006) TDZ, auxin and genotype effects on leaf organogenesis in *Fragaria*. *Plant Cell Rep* 25: 281 – 288
120. Magioli, C. & Mansur, E. (2005) Eggplant (*Solanum melongena* L.): tissue culture, genetic transformation and use as an alternative model plant. *Acta Bot. Bras* 19: 139 – 148
121. Barwale, U.; Kerns, H. & Widholm, J. (1986) Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. *Planta* 167: 473 -481