

MARIA YUMBLA ORBES

**PROPAGAÇÃO ASSEXUADA POR CULTURA DE TECIDOS E SEXUADA DE
LISIANTHUS (*Eustoma grandiflorum*)**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

**Y94p
2015**

Yumbla Orbes, Maria, 1979-

**Propagação assexuada por cultura de tecidos e sexuada de
Lisianthus (Eustoma grandiflorum) / Maria Yumbla Orbes. –
Viçosa, MG, 2015.**

xii, 161f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: José Geraldo Barbosa.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

**1. *Eustoma grandiflorum*. 2. Embriogênese somática.
3. Vernalização. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Fitotecnia. Programa de Pós-graduação em
Fitotecnia. II. Título.**

CDD 22. ed. 583.93

MARIA YUMBLA ORBES

**PROPAGAÇÃO ASSEXUADA POR CULTURA DE TECIDOS E SEXUADA DE
LISIANTHUS (*Eustoma grandiflorum*)**

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

APROVADA: 26 de março de 2015.

Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias

Marcelo de Oliveira Santos

Wagner Campos Otoni
(Coorientador)

Ana Claudia Ferreira da Cruz

José Geraldo Barbosa
(Orientador)

A mi querido Brasil.
Gracias, mil gracias.
Por su inmensa generosidad.
De su tierra y su gente.
Porque todo será para.....
Mi añorado ecuador....
Para mi tierra y mi gente.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitotecnia, pela oportunidade oferecida para realização deste trabalho.

Ao Ministério das Relações Exteriores do Brasil pela bolsa de estudos outorgada a traves do Programa de Estudantes-Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG).

Ao professor José Geraldo Barbosa, pela orientação e atenção durante a realização deste trabalho.

Ao professor Wagner Campos Otoni, pelo apoio, amizade e por ter-me aberto as portas do seu laboratório para trabalhar com o maravilhoso mundo de cultura de tecidos.

Aos professores Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias, Marcelo de Oliveira Santos, Ana Claudia Ferreira da Cruz pela atenção e sugestões.

Ao professor Cecon, pelo auxílio na estatística e pelos ensinamentos.

Aos demais professores da Universidade Federal de Viçosa, pelos conhecimentos transmitidos.

Ao amor da minha vida, meu pai Pepito pelas sabias palavras que sempre foram importantes para mim e por ter me ensinado a ver a vida menos complicada: “a vida é bela”.

A minha amada mãe Maria Bertha, pelo seu amor incondicional e pela paciência para escutar a minhas histórias e vivências.

Ao meu único querido irmão Roberto, pelo seu jeito tão especial e pela preocupação e carinho.

À toda minha família, pelos momentos de felicidades, apoio e conselhos oferecidos.

Ao Nicolás pelo amor, compreensão, conversas, risadas e pelos momentos inesquecíveis que passamos juntos.

Ao Antônio funcionário da Floricultura, pelo auxílio na realização do nosso trabalho e pela amizade.

Aos laboratórios de Anatomia Vegetal e ao Núcleo de microscopia eletrônica e microanálises pela ajuda indispensável nas análises do experimento.

As secretarias do Programa de Pós-graduação em Solos e Nutrição de Plantas, Tatiane e Lídia pelo excelente trabalho e dedicação.

A todos os amigos e colegas integrantes da grande família LCTII pela ajuda, paciência e ensinamentos transmitidos neste tempo.

A Ana, Marcos, Andréa, Diego e Thais que trabalharam junto comigo para a realização deste projeto e pela amizade.

As meninas Carol e Luana pelo apoio, carinho e pelos momentos agradáveis que passamos juntas.

A minha querida irmã colombiana no Brasil; Carito e sua família Renato e Isabella porque me fizeram sentir em casa.

Aos casais amigos, Carmen e Alexandre, Andreita e Javier, Sandra e Marcos, pela acolhida carinhosa e pela grande amizade.

Aos meus queridos amigos espalhados pelo mundo pelo amor e incentivo que sempre me ofereceram.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho:
MUCHAS GRACIAS.

ÍNDICE

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	1
FLORICULTURA E ESPÉCIE DE ESTUDO	1
PROPAGAÇÃO SEXUADA.....	4
PROPAGAÇÃO ASSEXUADA POR CULTURA DE TECIDOS.....	7
Embriogênese somática	9
Estudos anatômicos e histoquímicos	13
Gene marcador <i>SERK</i>	14
REFERÊNCIAS	17
CAPÍTULO 1: EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE LISIANTHUS (<i>Eustoma grandiflorum</i>) A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES: CARACTERIZAÇÃO MORFO-ANATÔMICA, HISTOQUÍMICA E EXPRESSÃO DO GENE <i>SERK</i>	28
RESUMO	28
SOMATIC EMBRYOGENESIS OF LYSIANTHUS (<i>Eustoma grandiflorum</i>) FROM LEAF EXPLANTS: MORPHO-ANATOMICAL HISTOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND <i>SERK</i> GENE EXPRESSION	29
ABSTRACT	29
INTRODUÇÃO	30
MATERIAL E MÉTODOS	34
Material vegetal e condições de cultivo	34
Indução de calos embriogênicos	34
Diferenciação e maturação dos embriões somáticos	34
Citometria de fluxo.....	35
Delineamento experimental e análises estatísticas	36
Indução de calos embriogênicos	36

Diferenciação e maturação dos embriões somáticos	36
Caracterização anatômica e histoquímica	37
Microscopia de luz e caracterização histoquímica	37
Caracterização micromorfológica: microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	38
Localização dos transcritos de <i>EgSERK</i> durante a embriogênese somática em	
<i>E. grandiflorum</i> por hibridização <i>in situ</i>	38
Coleta e preparo dos tecidos	38
Síntese das sondas sense e antisenso marcadas com digoxigenina	39
Reação de hibridização	39
Reação de pós-hibridização e detecção imunológica	39
RESULTADOS.....	41
Indução de embriogênese somática	41
Potencial de regeneração dos embriões somáticos.....	41
Citometria de fluxo.....	43
Desenvolvimento dos embriões somáticos.....	44
Caracterização histoquímica.....	44
Caracterização do padrão de expressão de <i>SERK</i> por hibridização <i>in situ</i>	46
DISCUSSÃO	46
Indução de culturas embriogênicas	46
Maturação dos embriões somáticos.....	48
Citometria de fluxo.....	50
Alterações morfológicas durante a embriogênese somática.....	50
Análises histoquímicas e mobilização de reservas.....	52
Expressão de genes <i>SERK</i> durante a embriogênese somática	53
REFERÊNCIAS.....	56
FIGURAS E LEGENDAS	70
CAPÍTULO 2: EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM EXPLANTES RADICULARES DE	
LISIANTHUS (<i>Eustoma grandiflorum</i>): CARACTERIZAÇÃO MORFO-ANATÔMICA,	
HISTOQUÍMICA E EXPRESSÃO DO GENE <i>SERK</i>	76
RESUMO	76
SOMATIC EMBRYOGENESIS FROM ROOT EXPLANTS OF LYSIANTHUS (<i>Eustoma</i>	
<i>grandiflorum</i>): MORPHO-ANATOMICAL AND HISTOCHEMICAL	
CHARACTERIATION AND EXPRESSION ANALYSIS OF <i>SERK</i> GENES	77

ABSTRACT	77
INTRODUÇÃO	78
MATERIAL E MÉTODOS	82
Material vegetal e condições de cultivo	82
Indução de calos embriogênicos	82
Diferenciação e maturação dos embriões somáticos	82
Delineamento experimental e análises estatísticas	83
Caracterização anatômica e histoquímica	84
Microscopia de luz e caracterização histoquímica	84
Caracterização micromorfológica: microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	84
Caracterização da expressão dos genes <i>SERK</i>	85
Extração de RNA total e síntese de cDNA	85
Amplificação e clonagem da sequência codificadora de <i>SERK</i>	85
Sequenciamento dos clones e análise das sequências.....	86
Análise filogenética	87
Localização dos transcritos de <i>EgSERK</i> durante a embriogênese somática em <i>E. grandiflorum</i> por hibridização <i>in situ</i>	87
Coleta e preparo dos tecidos	87
Síntese das sondas sense e antisense marcadas com digoxigenina.....	87
Reação de hibridização	88
Reação de pós-hibridização e detecção imunológica	88
RESULTADOS.....	90
Efeito da concentração do 2,4-D na indução de embriogênese somática.....	90
Potencial de regeneração de embriões somáticos.....	90
Desenvolvimento dos embriões somáticos.....	93
Caracterização histoquímica.....	94
Clonagem e análise da provável sequência codificadora de genes <i>SERK</i> expressos durante a embriogênese em <i>Eustoma grandiflorum</i>	95
Análise das sequências de nucleotídeos.....	95
Análise da sequência de aminoácidos preditas	96
Análise filogenética	97
Caracterização do padrão de expressão de <i>SERK</i> por hibridização <i>in situ</i>	97
DISCUSSÃO	99
Indução de culturas embriogênicas	99

Maturação dos embriões somáticos.....	100
Alterações anatômicas na embriogênese somática.....	102
Análises histoquímicas e mobilização de reservas.....	103
Comparação entre <i>EgSERK-like</i> e <i>SERK</i> de outras espécies.....	105
Expressão de genes <i>SERK</i> durante a embriogênese somática.....	107
REFERÊNCIAS.....	110
FIGURAS E LEGENDAS.....	125
CAPÍTULO 3: PRODUÇÃO DE MUDAS, CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS DE LISIANTHUS (<i>Eustoma grandiflorum</i>) ORIUNDAS DE SEMENTES VERNALIZADAS.....	133
RESUMO.....	133
SEEDLING PRODUCTION, GROWTH AND DEVELOPMENT OF LYSIANTHUS (<i>Eustoma grandiflorum</i>) PLANTS GROWN FROM VERNALIZED SEEDS.....	134
ABSTRACT.....	134
INTRODUÇÃO.....	135
MATERIAL E MÉTODOS.....	139
RESULTADOS.....	141
Caracterização do ambiente de cultivo.....	141
Efeitos da vernalização de sementes nas características de crescimento e desenvolvimento de plantas de lisianthus cv. Mariachi.....	141
Efeitos da vernalização de sementes nas características de crescimento e desenvolvimento de plantas de lisianthus cv. Echo.....	143
Efeitos da vernalização de sementes nas características de crescimento e desenvolvimento de plantas de lisianthus cv. Excalibur.....	144
DISCUSSÃO.....	146
Caracterização do ambiente de cultivo.....	146
Avaliações fitotécnicas no ponto de colheita.....	146
REFERÊNCIAS.....	151
TABELAS E LEGENDAS.....	154
FIGURAS E LEGENDAS.....	158

RESUMO

YUMBLA ORBES, Maria, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2015. **Propagação assexuada por cultura de tecidos e sexuada de lisianthus (*Eustoma grandiflorum*)**. Orientador: José Geraldo Barbosa. Coorientadores: Wagner Campos Otoni, Paulo Roberto Cecon, Eduardo Euclydes de Lima e Borges e José Antônio Saraiva Grossi.

A propagação do *E. grandiflorum* ocorre de forma sexuada e assexuada. Sendo que, a propagação por sementes apresenta ampla variabilidade genética com relação a muitas características importantes, incluindo ciclo de desenvolvimento, taxa de crescimento, formato da folha, coloração das flores, morfologia da inflorescência, sensibilidade ao etileno e indução ao florescimento que é influenciado pelo comprimento do dia e pela temperatura. A exposição de cultivares de lisianthus a temperaturas elevadas, durante e após a germinação das sementes pode levar à indução da formação da planta em roseta, inibindo o florescimento. Uma das técnicas utilizadas para evitar este distúrbio fisiológico é a exposição das sementes ou mudas a determinados períodos de frio, permite o crescimento e desenvolvimento normal das plantas, bem como diferenciação da gema vegetativa em reprodutiva. Por outro lado, programas de melhoramento também são direcionados no sentido de aumentar a tolerância da planta a temperaturas elevadas, bem como às doenças, à germinação das sementes e vigor das mudas, indução e uniformidade de floração e vida pós-colheita, tornando-se dessa forma necessário mais estudos na área de propagação sexuada e assexuada. Objetivou-se propor um protocolo eficiente de embriogênese somática a partir de explantes foliares e radiculares de *E. grandifloru*, caracterização morfo-anatômica e molecular do processo. Assim como, avaliar o efeito da vernalização das sementes na produção de mudas e no florescimento das cultivares Mariachi, Echo e Excalibur. Após os estudos de embriogênese somática realizados, recomenda-se o uso de 10 μ M de 2,4-D na fase de indução embriogênica de explantes foliares e radiculares com permanência de 30 e 40 dias, respectivamente. Para a fase de diferenciação e maturação de embriões somáticos, recomenda-se o uso de 2 μ M de BA no meio. Os estudos anatômicos realizados comprovaram que a origem de calos embriogênicos está associada às intensas divisões anticlinais e periclinais de células do sistema vascular. Após a transferência dos embriões somáticos para o meio de diferenciação e maturação observou-se germinação assincrônica e regeneração de vitroplantas. Os testes histoquímicos indicaram a presença e

mobilização de compostos de reserva ao longo da embriogênese somática nas células. Foram isoladas duas sequências parciais de *SERK*, as quais constituem possíveis homólogos de *SERK1* e *SERK3*, provavelmente associados com aquisição de competência embriogênica das células somáticas. O sinal de expressão de *SERK* somente foi observado com o início das divisões celulares e estendeu-se ao longo do desenvolvimento embriogênico sendo mais intenso nos pró-embriões. Os dados obtidos no presente trabalho podem auxiliar em futuras pesquisas para transformação genética, bem como, para identificação de outros genes marcadores da embriogênese somática, assim como dos fatores envolvidos na transição embriogênica. Para os tratamentos de vernalização de sementes de *E. grandiflorum* conclui-se que o uso de temperaturas de 5 e 10 °C levou à maior eficiência na indução do florescimento e redução do ciclo de cultivo. Recomenda-se vernalizar as sementes por 24 d a 5 °C para as cultivares Mariachi e Echo e para a cultivar Excalibur recomenda-se a vernalização das sementes por 36 d a 5 °C para a produção de mudas de lisianthus de alta qualidade.

ABSTRACT

YUMBLA ORBES, Maria, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2015. **Asexual propagation by tissue culture and sexual of lysianthus (*Eustoma grandiflorum*).** Adviser: José Geraldo Barbosa. Co-advisers: Wagner Campos Otoni, Paulo Roberto Cecon, Eduardo Euclides de Lima e Borges and José Antônio Saraiva Grossi.

The spread of *E. grandiflorum* occurs by sexual and asexual form. Propagation by seeds has great variability in many important features, including development cycle, growth rate, leaf shape, color of flowers, inflorescence morphology, ethylene sensitivity and induction of flowering which is influenced by day length and temperature. Exposure of lysianthus cultivars to high temperatures during and after seeds germination can lead to plant rosette formation and inhibition of flowering. One of the techniques used to avoid this physiological disorder is the exposure of the seeds or seedlings to periods of cold temperatures, allowing normal growth and development of plants, as well as differentiation of vegetative bud in reproductive one. On the other hand, breeding programs aimed to increase plant tolerance to high temperatures as well as to diseases, seed germination and seedling vigor, flowering induction and uniformity, and post-harvest life, leading to the need of more studies in the sexual and asexual propagation. This work aims to develop an efficient protocol of somatic embryogenesis from leaf and root explants of *E. grandiflorum*, by studying the cytological and molecular changes at different stages of embryogenic cultures. The study also evaluates the vernalization seeds effect in the production of seedlings and flowering of Mariachi, Echo and Excalibur cultivars. Our results suggest the use of 10 μM of 2,4-D in embryo induction phase of leaf and root explants for the period of 30 and 40 days, respectively. For the differentiation and maturation phase of somatic embryos we recommend the use of 2 μM BA. The anatomical studies performed showed that the origin of somatic embryogenesis is associated with intense anticlinal and periclinal divisions of vascular system cells. We observed asynchronous germination and seedling regeneration after transferring the somatic embryos to the differentiation and maturation medium. The histochemical analysis indicated the presence and mobilization of storage compounds along the somatic embryogenesis in cells. Two partial sequences of potential homologs of *SERK1* and *SERK3* were isolated, and probably associated with acquisition of embryogenic competence of somatic cells. The *SERK* expression signal was only observed

with the beginning of cell divisions and increased gradually along the embryonic induction with a strong signal in the pro-embryos. The results obtained in this study can be useful for future research in genetic transformation, as well as for the identification of other marker genes of somatic embryogenesis, and factors involved in embryogenic transition. For vernalization of *lysianthus* seeds treatments greater flowering induction efficiency and a reduction in crops lifecycle was obtained when using we conclude that the use of 5 or 10 °C temperatures. For Mariachi and Echo cultivars is recommended seed vernalization at 5 °C for 24 days f and for cv. Mariachi is recommended to vernalized at 5 °C for 36 day in order to obtain high quality *lysianthus* seedlings.

INTRODUÇÃO GERAL

REVISÃO DE LITERATURA

FLORICULTURA E ESPÉCIE DE ESTUDO

Entende-se a floricultura como a atividade agrícola de exploração intensiva e de cunho empresarial, que trata da produção e da comercialização de flores e plantas ornamentais. Inicialmente, a produção e consumo de produtos da floricultura concentrava-se em alguns países europeus (Holanda, Itália e Dinamarca) e asiáticos (Japão) (Souza 2011). No entanto, esta realidade vem se alterando com o decorrer dos anos, onde pode-se observar maior participação de outros países no setor. Um exemplo é a participação de países da América Latina (Colômbia e Equador) na produção de flores de corte, mostrando que o mercado mundial de flores e plantas ornamentais está em plena expansão.

O agronegócio da floricultura no Brasil ganha qualidade e competitividade e o desempenho nas duas últimas décadas tem sido bastante satisfatório. As estimativas do Ibraflor (2013) indicam que a área envolvida na atividade de plantas e flores ornamentais no Brasil, em 2013, foi de 13.800 ha, com faturamento de R\$ 5,2 bilhões. Estimando-se para o ano de 2014 um crescimento do setor na ordem de 8 a 10 %. Desde 2006 o segmento de flores tem registrado altas de 8 a 15 % em volume e de 15 a 17 % em valor. As exportações movimentaram em torno de US\$ 20.700.000 no ano 2011, sendo segmentado o mercado dos produtos da floricultura em quatro grupos: mudas de plantas ornamentais (40,33 %), bulbos, tubérculos, rizomas e similares (48,37 %); flores frescas (3,67 %) e outros, plantas vivas em vasos ou de raiz para fins ornamentais (7,63).

Dentre os produtos exportados, destacam-se as flores tropicais (helicônias, bromélias e antúrios), as rosas, as flores secas, os gladiólos, os lisianthus, as gérbervas, os bulbos, as mudas de cordilines e dracenas, as folhagens, as sementes de palmeiras e as mudas de orquídeas, gerânios e crisântemos. A exportação é destinada principalmente para os Estados Unidos, Países Baixos, Portugal, Canadá e Alemanha (Agrianual 2009), sendo que atualmente no segmento de flores de corte as principais espécies comercializadas no país são: rosas, crisântemos, lisianthus, gérbervas e lírios.

O lisianthus, *Eustoma grandiflorum* Gentianaceae, é originária da região sul dos Estados Unidos, sendo introduzido no Brasil ao final da década de 80, tornando-se muito

popular como flor-de-corte e planta envasada. A propagação do *E. grandiflorum* ocorre de forma sexuada e assexuada, sendo realizada comercialmente por sementes.

É uma espécie herbácea com caule ereto que dependendo das técnicas culturais pode ser de ciclo anual ou bienal, sendo cultivada como planta anual, tolerante a geadas, exigindo temperaturas amenas para seu bom desenvolvimento (Lorenzi e Moreira de Souza 2008). Na natureza, no inverno o lisianthus tem crescimento lento e em forma de roseta; o alongamento do ramo ocorre na primavera e o florescimento no verão (Dole e Wilkins 2005a). Assim, o ciclo da cultura pode ser dividido em dois estádios. O primeiro estágio tem a duração média de dois a três meses e se inicia com a germinação da semente e as plantas crescem em forma de roseta, até atingirem quatro pares de folhas completamente formadas. O segundo estágio tem início após os três primeiros meses e compreende a elongação da haste, formação de novas folhas e o início do florescimento (Costantin 2014).

O lisianthus preferencialmente é cultivado em regiões áridas e semi-áridas em condições de casa de vegetação coberta por plástico (Pivonia et al 2010). As flores são duráveis, grandes, em forma de sino, com pétalas simples ou duplas, sendo as cultivares de pétalas duplas, com diversas matizes de cores simples ou mistas (brancas, róseas, roxas, vermelhas, dentre outras), mais populares (Lorenzi e Moreira de Souza 2008).

Esta espécie apresenta ampla variabilidade genética com relação a muitas características importantes, incluindo ciclo de desenvolvimento, taxa de crescimento, formato da folha, coloração das flores, morfologia da inflorescência, sensibilidade ao etileno (Alves 2012) e indução ao florescimento que é influenciado pela temperatura e pelo comprimento do dia. Assim, em função ao comportamento varietal em respostas ao fotoperíodo as cultivares de *E. grandiflorum* foram classificadas como plantas de dia neutro (Halevy e Kofranek 1984; Harbaugh 2007a) e de dia longo facultativas (Zaccai e Edri 2002). As plantas de dia neutro são aquelas que não apresentam resposta à duração do dia (Salisbury e Ross 1992a). Por outro lado, o florescimento das plantas de dia longo facultativo é diretamente influenciado pela temperatura e o fotoperíodo (Harbaugh 2007a). Segundo Zaccai e Edri (2002), a maioria das cultivares de lisianthus comercializadas enquadram-se como plantas de DL facultativas. No entanto essa classificação varia a cada ano, devido aos avanços na área de melhoramento quanto à procura de novas cultivares que não sejam influenciadas pelo fotoperíodo, facilitando dessa forma aos produtores o manejo

da cultura, consequentemente aumentando o mercado da espécie. Embora o comprimento do dia esteja relacionado com o florescimento, a temperatura tem importância determinante na floração do lisianthus. Neste sentido, na produção comercial, o tratamento com frio pode aplicado em sementes, na fase de formação da muda ou mesmo na planta estabelecida, fenômeno fisiológico denominado vernalização.

No mercado existem numerosas cultivares e novas são lançadas a cada ano com novas características, tais como coloração, tamanho e formato da flor (Harbaugh 2007b) que atraem o consumidor pela sua beleza. Programas de melhoramento são direcionados no sentido de aumentar a tolerância da planta a temperaturas elevadas (menos sensíveis ao rosetamento), às doenças (Harbaugh e Scott 2003), à germinação das sementes e vigor das mudas, assim como indução e uniformidade de floração e vida pós-colheita (Dole e Wilkins 2005a). Assim, devido a esta variabilidade tornam-se necessários estudos sobre as principais características de produção como propagação, ciclo, porte da planta, produção e pós-colheita das flores cortadas e, principalmente, controle do florescimento.

No Brasil, *E. grandiflorum* é uma espécie ainda pouco conhecida e necessita de mais estudos para otimização da produção, uma vez que nossas condições de cultivo, principalmente quanto à temperatura, são diferentes das encontradas nas regiões de evolução do lisianthus. Na produção para corte é importante o controle da formação da mudas e do crescimento das plantas para se obter um produto com a qualidade desejada pelo mercado como comprimento e rigidez da haste, o que pode ser controlado ou otimizado.

Assim, este trabalho aborda os métodos de produção sexuada e assexuada via cultura de tecidos de variedades de lisianthus com ênfase:

- a. No efeito da vernalização das sementes na produção de mudas e no florescimento de lisianthus.
- b. Na obtenção de mudas via embriogênese somática a partir de segmentos foliares e radiculares, bem como caracterização morfo-anatômica e molecular do processo.

PROPAGAÇÃO SEXUADA

O lisianthus pode ser propagado de forma sexuada, sendo que a germinação ocorre entre oito a doze dias a 20-25 °C, sendo as sementes dispostas superficialmente e cobertas com vermiculita, preferencialmente média, para manter a umidade (Gruszysnski 2007).

Muitas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de estudar a fisiologia do florescimento em lisianthus, e determinar as causas do crescimento em forma de roseta. Assim, os estudos relatam que a planta apresenta sensibilidade à interação entre temperatura elevada e duração do dia, em função do comportamento varietal, durante e após a germinação das sementes, até a formação do segundo ou terceiro par de folhas verdadeiras (Harbaugh 1995; Harbaugh 2007a).

O fotoperiodismo ou a capacidade de uma planta detectar o comprimento do dia torna possível que um evento fisiológico possa acontecer em determinada época do ano, permitindo desse modo uma resposta sazonal. As respostas das plantas controladas pelo comprimento do dia são numerosas, incluindo a reprodução assexual, a formação de órgão de reserva, a indução à dormência e a iniciação ao florescimento (Taiz e Zeiger, 2013a).

Comercialmente foram desenvolvidas cultivares de *E. grandiflorum* em função da época do ano em que são cultivadas (verão, outono, inverno ou primavera) adaptadas às diferentes condições ambientais, visando diminuir a sensibilidade às temperaturas elevadas e ao fotoperíodo. Assim, as cultivares de lisianthus são divididas em: grupos 0, 1, 2 e 3. As hastes florais do grupo 0 possuem de 9 a 10 nós e são representadas por variedades super precoces, recomendando-se o plantio no outono e primavera. As variedades Fioretti[®] (flor simples micro spray) e Borealis[®] (flor dupla stander) são alguns exemplos deste grupo. O grupo 1 apresenta hastes com 12 nós e é considerado precoce, como as variedades Piccolo[®] 1 (flor simples spray), Rosita[®] 1 (flor dupla spray), Wonderous[®] (flor simples stander) e Echo[®] (flor dupla stander). O grupo 2 é de ciclo intermediário e as hastes podem ter até 15 nós, sendo plantadas no início do verão como, por exemplo, as variedades Piccolo[®] 2 (flor simples spray), Rosita[®] 2 (flor dupla spray), Excalibur[®] (flor dupla stander), Mariachi[®] (flor quádrupla) e Flamenco[®] (flor simples stander). O grupo 3 é o grupo mais tardio produzindo hastes que chegam a formar até 18 nós sendo que, as cultivares Mariachi[®] Grande White (flor quádrupla) e Rosita[®] 3 (flor dupla spray) pertencem a esse grupo. As sementes de lisianthus mais comercializadas anteriormente pertenciam aos grupos Echo,

Heidi e Flamenco, cujas flores são simples ou duplas e com poucas pétalas. Atualmente o grupo mais comercializado é o Mariachi, o qual apresenta plantas com flores quádruplas, mais compactas e com muitas pétalas. Segundo a Empresa “Sakata Ornamentals[®]”, os diferentes grupos de lisianthus se encontram disponíveis para manter suficiente comprimento de haste para diferentes climas e épocas de cultivo, em função do mercado.

Por outro lado, segundo Harbaugh e Scott (1999), as cultivares de lisianthus podem ser classificadas de acordo com a sensibilidade a altas temperaturas em sensíveis pouco sensíveis e tolerantes. Logo, o crescimento das plantas de lisianthus pode apresentar os seguintes padrões:

- Plantas em forma de roseta, apresentando aglomerado basal de folhas, internódios muito curtos ou sem internódios, sem indução ao florescimento;
- Plantas semi-rosetadas, que embora apresentem emissão da haste floral e floresçam, produzem hastes de baixa qualidade com inflorescências menores, assim como ciclo de florescimento desuniforme;
- Plantas normais, cujo crescimento e desenvolvimento são lentos no início, caracterizado pela fase juvenil das plantas seguido da indução ao florescimento, provendo hastes longas e firmes, como demandadas pelo mercado.

Torna-se possível utilizar algumas variedades de lisianthus durante todo o ano com manipulação do fotoperíodo e da temperatura (Sakata 2010). Assim, o fornecimento de baixas temperaturas é uma estratégia bem sucedida para diminuir os problemas de dormência na semente e florescimento de lisianthus, sendo que a vernalização pode ser fornecida tanto para as sementes e/ou mudas (Pergola et al 1992). A vernalização é o processo pelo qual o florescimento é promovido ou acelerado exposição a baixa temperatura a uma semente completamente hidratada (embebida em água) ou a uma planta em crescimento (Chouard 1960). Sementes secas não respondem ao tratamento de frio já que para que a vernalização aconteça é necessária atividade metabólica. Fontes de energia (açúcares) e oxigênio também são requeridas. Por outro lado, temperaturas abaixo do congelamento que suprimem a atividade metabólica não são efetivas para a vernalização (Michaels e Amasino 2000).

Em termos de desenvolvimento, a vernalização resulta na aquisição da competência do meristema de realizar a transição floral após um tratamento de frio. A transição para o

florescimento envolve um sistema complexo de fatores que interagem, incluindo, entre outros, carboidratos, giberelinas, citocininas. Sinais transmissíveis gerados na folha são necessários para a determinação do ápice (Taiz e Zeiger 2004), induzindo à diferenciação da gema vegetativa em reprodutiva e culminando com o florescimento. Os sinais adquiridos na vernalização são transferidos através de divisões celulares mitóticas, porém esses sinais não são herdados para as próximas gerações (Dennis e Peacock 2007).

Na década de 1930, Mikhail Chailakhyan postulou a existência de um hormônio universal de florescimento, que ele denominou de florígeno. Por outro lado, Melchers foi quem hipotetizou a produção de “vernalina”, substância que induz o florescimento em plantas exigentes em vernalização (Salisbury e Ross 1992b). Porém, depois de anos de investigação, nenhuma substância foi identificada como sendo o estímulo floral universal, embora certos hormônios, como giberelinas e etileno, possam induzir o florescimento em algumas espécies. Assim, a maioria dos modelos atuais do estímulo floral baseia-se em múltiplos fatores (Taiz e Zeiger 2004).

Estudos genéticos estabelecem que o florescimento está governado por rotas de desenvolvimento que reagem a sinais endógenos da planta (autônoma, giberelinas, relógio circadiano, idade e carboidratos) e estímulos ambientais (vernalização, temperatura ambiente e fotoperíodo). Todas as rotas convergem para a expressão de genes chaves que conferem identidade ao meristema floral (*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)*, *FLOWERING LOCUS T (FT)* e *AGAMOUS- LIKE24 (AGL24)* (*AGAMOUS-LIKE*) (Blázquez 2000; Dally et al 2015).

Assim, plantas que precisam de baixas temperaturas num determinado estágio do desenvolvimento podem sofrer alterações morfo-fisiológicas e não se desenvolvem adequadamente em resposta às condições adversas ao ambiente. As espécies diferem consideravelmente quanto à idade em que se tornam sensíveis à vernalização; desta forma, muitas espécies podem ser vernalizadas antes da germinação das sementes. Outras plantas precisam atingir um tamanho mínimo antes de se tornarem sensíveis a baixas temperaturas (Taiz e Zeiger 2013a). A temperatura efetiva e o tempo de exposição ao frio, necessários para atingir o estado de vernalização varia entre as espécies e as cultivares (Kim et al 2009).

Oka et al. (2001), observaram que plantas de *E. grandiflorum* rosetadas e não vernalizadas apresentaram baixas taxas de alongamento do caule. Além disso, as concentrações de GA₃ nas plantas foram inferiores quando comparadas com as plantas vernalizadas. Com isso os pesquisadores concluíram que a vernalização é essencial para a biossíntese de giberelinas nas plantas que crescem em forma de roseta, assim como também a vernalização aumenta a sensibilidade das plantas às giberelinas via transdução de sinais.

PROPAGAÇÃO ASSEXUADA POR CULTURA DE TECIDOS

O lisianthus pode ser propagado de forma assexuada, por estacas e via cultura de tecidos. Na propagação pela via sexuada de lisianthus, o tamanho das sementes (aproximadamente 20.000 sementes/g) constitui um complicador já que é necessária uma cuidadosa e vagarosa manipulação das mesmas durante a germinação, requerendo mais tempo e cuidado do que outras espécies (Barrueto Cid e Teixeira 2006). Outro problema na propagação do lisianthus é a ampla variabilidade existente entre as sementes, particularmente na formação de roseta pela exposição das mudas a temperaturas elevadas, na falta de uniformidade da floração, no comprimento das mudas e/ou plantas e do número de flores por planta (Furukawa et al 1990). Assim, a técnica de propagação *in vitro* pode ser utilizada para a propagação clonal acelerada de plantas de lisianthus possibilitando um sistema de regeneração eficiente.

Em flores e plantas ornamentais a aplicação da técnica da cultura de tecidos vegetais constitui a atividade de maior importância nos laboratórios comerciais. O número de espécies propagadas por cultura de tecidos aumentou consideravelmente durante a década de 1980, principalmente para as ornamentais, seguida das olerícolas, fruteiras e espécies florestais (Portugal Pinto de Carvalho et al 2009). Assim, a aplicação da técnica de cultura de tecidos na propagação de plantas ornamentais foi aceita como uma prática padrão na indústria hortícola (Read e Preece 2009). Mais de um bilhão de plantas ornamentais comercializadas são produzidos através de cultura de tecidos. A maior parte concentra-se na propagação *in vitro* de flores e plantas de vaso, enquanto plantas ornamentais perenes e plantas de jardim representam apenas 2 % do total de plantas ornamentais produzidas por cultura de tecidos (Prakash e Nagar 2009; Amoo et al 2010).

No Brasil, levantamento realizado em 1995 indicou a existência de um elevado número de laboratórios particulares de propagação *in vitro*, os quais multiplicam espécies ornamentais, principalmente no estado de São Paulo, sendo que as mais estudadas em laboratórios de pesquisa eram: alstroemeria, amarílis, antúrio, áster, bromélias, cravo, crisântemo, estaticia, gérbera, *Gomphrena*, *Gypsophila*, helicônia, lírio, lisianthus, *Nematanthus*, nerine, rosa, samambaias, *Spathiphyllum*, violeta e zingiberáceas (Tombolato e Costa 1998).

Entre as vantagens de se propagar o lisianthus por cultura de tecidos tem-se obtenção de plantas livres de pragas e doenças num período curto de tempo sem perda de suas características genéticas, facilidade de produção em grande escala de material elite com características desejadas (alta produtividade, resistência a pragas e doenças, rápida taxa de crescimento, entre outras). Além, disso, torna-se necessário disponibilizar procedimentos de propagação *in vitro* mais eficientes visando trabalhos de transformação genética para melhorar seu aspecto ornamental e aumentar a oferta de genótipos elites para cultivo no campo (Barrueto Cid e Teixeira 2006).

Para iniciar o cultivo *in vitro* é utilizado um segmento ou órgão vegetal retirado da planta matriz denominado explante. O nível de diferenciação e a fase de desenvolvimento em que se encontra o tecido têm maior influência nas respostas morfogenéticas do material, sendo dois aspectos importantes a serem considerados no momento da seleção do explante (Junghans e Santos-Serejo 2006), de acordo com a espécie, a fonte de explante pode ser mais ou menos responsiva às condições de cultivo (Guerra et al 1998).

A seleção do explante para ser cultivado nas distintas técnicas de propagação possui uma ampla gama de tipos de tecidos da planta, assim como: fragmentos radiculares, hipocótilos, cotilédones, flores, folhas, grãos de pólen, embriões, óvulos, nós, gemas axilares ou apicais, sendo que o objetivo é a obtenção de um explante livre de contaminantes, vigoroso fisiologicamente e que responda satisfatoriamente à propagação *in vitro* (Xavier et al 2009). Assim, também os estudos tem demonstrado que o estágio de desenvolvimento da planta matriz também influenciará a resposta do cultivo *in vitro* (Von Arnold 2008).

Outro parâmetro que merece destaque é a escolha dos reguladores de crescimento utilizados, assim como o período de exposição ao mesmo, podendo ser crucial no

estabelecimento de um protocolo de propagação *in vitro* (Elmeer Suliman 2013). Dependendo do objetivo do trabalho os reguladores de crescimento utilizados podem ser auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico, brassinosteroides, triacontanol e ácido jasmônico. Assim, de acordo com o regulador utilizado no meio de cultivo e as condições ambientais pode-se induzir embriogênese somática, organogênese adventícia, organogênese ou calogênese.

Embriogênese somática

Na morfogênese *in vitro* existem duas vias: a embriogênese somática e a organogênese. Dentre essas possibilidades a embriogênese somática possui um papel de destaque já que apresenta um sistema eficiente para regeneração de plantas em larga escala, bem como para a compreensão dos aspectos morfo-fisiológicos e moleculares nos processos de desenvolvimento das plantas (Fehér et al 2003; Yang e Zhang 2010; Otoni et al 2013).

A embriogênese representa um período crítico no ciclo da vida das plantas. Inicia-se com a fertilização do óvulo, logo em seguida o zigoto sofre rápidas divisões mitóticas levando-o, por fim, ao desenvolvimento do embrião (Karami et al 2009). Durante este processo, a polaridade da planta é determinada, assim como o estabelecimento do padrão apical-basal e radial do corpo da planta. Há especificação dos meristemas caulinares e radiculares, assim como a formação dos tecidos do sistema embrionário. Alternativamente, à embriogênese zigótica pode ocorrer de forma assexuada: a embriogênese somática, processo que não envolve fertilização nem fusão de gametas, ocorrendo a partir de células somáticas (Rocha e Dornelas 2013). Assim a embriogênese somática é um método de propagação de plantas onde células somáticas sofrem alteração na rota de diferenciação e tornam-se competentes para formar embriões (Zimmerman 1993; Fehér 2005; Rocha e Dornelas 2013).

Em geral a embriogênese somática é caracterizada pela formação de uma estrutura bipolar, no qual seus domínios (meristemas radicular e caulinares) são formados num único eixo e temporalmente sincronizados (Peres 2002). Manifestam um sistema vascular fechado, em conexão com o tecido de origem no explante (Crouch 1982). Existem dois padrões básicos de expressão da embriogênese somática: 1. modelo direto, no qual os embriões somáticos originam-se dos tecidos matrizes sem a formação de estágios

intermediários de calos; 2. modelo indireto, no qual os embriões somáticos se formam a partir de um tecido intermediário chamado calo, que apresenta células em diferentes estágios de diferenciação e, conseqüentemente, com diferentes graus de determinação (Guerra et al 1998).

A embriogênese somática, permite a reprodução massiva de muitas espécies de plantas com vista em sua conservação, desde que suas características genéticas sejam respeitadas. Outras aplicações estão relacionadas com o saneamento, a reprodução de plantas elite providas de programas de melhoramento genético e a reprodução de plantas transgênicas únicas constituídas por produtos de transformação da engenharia genética (Zimmermann 2010; Smertenko e Bozhkov 2014)

O conhecimento dos requisitos necessários para o cultivo *in vitro*, juntamente com as adaptações metodológicas, permite cultivar células em biorreatores com produção automatizada, e praticamente indefinida, de numerosas espécies de planta, bem como a obtenção de produtos de seu metabolismo (Vasil 1994; Yeung 1995). Ao mesmo tempo, é possível conservar esse material mediante a criopreservação com subsequente criação de bancos de genes (Von Arnold 2008). Além disso, os embriões maduros podem ser armazenados e encapsulados em compostos como alginato, o que conduz à geração de sementes sintéticas (Redenbaugh et al 1986; Redenbaugh et al 1991). Assim, o modelo que embasa o entendimento do desenvolvimento embriogênico é uma poderosa ferramenta para multiplicação e a geração de grande número de indivíduos geneticamente iguais.

O processo de embriogênese somática está dividido em duas fases: indução e maturação. Na fase de indução, as células somáticas (totipotentes) adquirem competência embriogênica e proliferam-se como células embriogênicas, já na fase de maturação, as células embriogênicas rediferenciam-se para formar embriões somáticos. As duas fases agem independentemente e são influenciadas por diferentes fatores (Jiménez 2001; Namasivayam 2007). Sabe-se que o nível endógeno de fito-hormônios (auxinas, citocininas e ABA) do material confere maior ou menor grau de competência embriogênica. Assim, explantes com alto nível de auxinas endógenas são mais sensíveis e responsivos ao uso de reguladores de crescimento no meio de cultivo, podendo inclusive não precisar da adição de reguladores para induzir embriogênese somática (Fehér 2008).

Por outro lado o potencial embriogênico do material cultivado *in vitro* vai depender também da sensibilidade específica dos tecidos/células aos sinais de estresse e/ou hormonais exógenos (Gaj 2004). Igualmente, a indução de embriogênese somática é determinado não só pela alta eficiência do material em produzir embriões somáticos, mas depende da capacidade dos embriões somáticos em originar plantas (Redenbaugh et al 1986).

O uso de reguladores de crescimento no meio de cultivo é fundamental para à indução e maturação de embriogênese somática em algumas espécies (Gaj 2004; Zavattieri et al 2010). Todavia, em muitos casos o estresse químico e/ou físico como concentrações elevadas de sacarose, altas temperaturas e presença de metais pesados no meio de cultivo foram estímulos suficientes e mais eficientes para a indução de embriogênese somática. De tal modo, a interação entre esses fatores tem papel importante na transdução de sinais que levam à reprogramação da expressão gênica do material, acompanhado de divisões celulares as quais induzem o crescimento polarizada acarretando a formação de embriões somáticos (Rocha e Dornelas 2013).

A composição e a concentração relativa do regulador de crescimento utilizada no meio de cultivo determinarão a capacidade de resposta do explante/cultura, assim como a maneira morfogênica de reagir (Gaj 2004). Assim também, o uso de auxina e citocininas separadamente possui o mesmo efeito que cultivar o material com os dois reguladores de crescimento no mesmo meio (Staden et al 2008).

Entre os reguladores de crescimento as auxinas são reconhecidas como essenciais na indução da embriogênese, consideradas como um dos fatores principais envolvidos na aquisição da competência embriogênica dos tecidos somáticos (Fujimura e Komamine 1980; Pasternak et al 2002). Mais de 80 % dos protocolos de embriogênese somática utilizam auxinas ou auxina/citocininas no meio de indução. A principal finalidade do uso de reguladores de crescimento no meio de indução é criar um gradiente de transporte de auxina-AIA para o estabelecimento da simetria bilateral na fase inicial da embriogênese, sendo um pré-requisito para o desenvolvimento embrionário (Schiavone e Cooke 1987; Liu et al 1993; Fischer e Neuhaus 1996). Assim, para estabelecer esse gradiente de auxina é necessário altos níveis de AIA nos tecidos competentes (Jiménez 2005)

Entre as auxinas, o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é o mais usado para a indução de embriogênese somática de forma isolada ou em combinação com outro regulador de crescimento (Gaj 2004). A alta eficiência do 2,4-D na indução de embriogênese somática no cultivo *in vitro* de diferentes espécies possui um caráter específico e exclusivo que compete a este regulador de crescimento. Assim, o uso deste regulador de crescimento sintético parece agir não só como análogo auxínico mas também como um fator de estresse eficaz. Trabalhos mostram que o uso de 2,4-D acarreta reprogramação celular na expressão gênica, do mesmo modo que modificações fisiológicas como: aumento dos níveis endógenos de auxina, controlando dessa forma a polaridade celular, e desencadeando assim o início do desenvolvimento embriogênico (Fehér et al 2003).

Durante a fase de maturação, os calos embriogênicos estão comprometidos a gerar embriões somáticos, esta fase geralmente exige diminuição ou remoção total da concentração de auxinas para o desenvolvimento dos embriões, de tal modo a remoção da auxina no meio de indução gera inativação de genes paralisando assim o processo de embriogênese somática (Elmeer 2013), assim a permanência do material por um período longo no meio de indução com auxina pode levar à paralisação do desenvolvimento embrionário e/ou perda do potencial embriogênico, além disso, o uso prolongado de 2,4-D pode ser o responsável por variações genéticas e epigenéticas das culturas (Von Arnold 2008). Dessa forma, foi estudado que a exposição contínua a elevada concentração de auxina interfere no gradiente de translocação da auxina estabelecido durante o processo de indução embriogênica, impedindo a correta simetria bilateral do embrião (Jiménez e Thomas 2005).

Uma vez que os embriões somáticos atingem o tamanho ideal é necessário trocá-los de meio de cultivo, para permitir o desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular, assim juntamente com a demanda de auxinas, ressalta-se a importância da presença de citocininas no meio de cultivo, geralmente a alternância entre estes fito-hormônios é requerida para o sucesso da embriogênese somática (Zimmermann 2010), da mesma forma o uso de GA₃ durante a fase final do desenvolvimento tem facilitado uma rápida germinação de embriões somáticos (Zlenko et al 2002). Hartmann et al (2002) relatam a

necessidade de vernalização e/ou uso de fito-hormônios (giberelinas ou citocininas) para quebrar a dormência que muitas vezes podem apresentar os embriões somáticos.

A característica mais relevante do uso de citocininas no cultivo *in vitro* é a influência na proliferação e diferenciação celular (Elmeer 2013). As citocininas mais usadas no meio de cultivo são N6-benzilaminopurina (BA), cinetina, zeatina e tidiazuron (Jiménez e Thomas 2005; Von Arnold 2008). A presença de citocinina pode aumentar o número de embriões somáticos, porém, níveis endógenos elevados de citocinina nos tecidos vegetais estão associados à falta de resposta embriogênica em duas espécies herbáceas eudicotiledôneas (Brown et al 1995).

A aplicação exógena de ácido giberélico (GA₃) em várias espécies inibe ou diminui a formação de embriões somáticos; entretanto também foi relatado que as giberelinas (GAs) e o ácido abscísico (ABA) possuem papéis importantes na germinação e na regulação do desenvolvimento de embriões somáticos em *Vitis vinifera* x *Vitis rupestris* (Takeno et al 2006). Choi et al (1999) também relataram a importância do uso de GA₃ no meio de cultivo e/ou tratamento de vernalização para germinação de embriões somáticos de *Panax ginseng* em estado de dormência. Essa característica do GA₃ de inibir ou promover o desenvolvimento de embriões somáticos está relacionado provavelmente a inibição da indução de zonas pró-embriogênicas, por outro lado é requerido para o desenvolvimento dessas zonas uma vez formadas (Moshkov et al 2008).

Assim, torna-se crucial saber o período de permanência do material em cada fase da embriogênese somática para se ter sucesso no processo. Cultivar o material por um período extenso no meio de indução suplementado com auxina pode levar à paralisação do desenvolvimento embrionário e/ou a perda do potencial embriogênico do material (Von Arnold 2008). Existe uma relação entre a taxa de proliferação celular e o potencial embriogênico; geralmente, a proliferação lenta retém o potencial por muito mais tempo do que a proliferação acelerada, assim a diminuição ou a eliminação do regulador de crescimento do meio leva a desaceleração na proliferação celular, prolongando dessa forma o potencial embriogênico do material (Elmeer 2013).

Estudos anatômicos e histoquímicos

O estudo do desenvolvimento dos sistemas de regeneração, sob aspectos citológicos, pode otimizar a eficiência dos mesmos, bem como na seleção e validação

desses sistemas para serem utilizados em protocolos de transformação genética (Shang et al 2009). O estudo histológico de indução de gemas adventícias tornou claro que o processo envolve mais de uma célula atuando de forma coordenada. Já a embriogênese somática pode ser de origem unicelular ou pluricelular (Von Arnold 2008).

Trabalhos anatômico-histológicos em embriogênese somática são importantes para o conhecimento dos processos que acontecem ao longo do cultivo *in vitro*, de um explante. Os estudos anatômicos têm fornecido descrições detalhadas das alterações envolvidas na aquisição de competência embriogênica e histodiferenciação de embriões somáticos (Moura et al 2008; Moura et al 2010; Solís-Ramos et al 2010). De acordo com o desenvolvimento dos embriões somáticos, estes podem ter origem unicelular, quando são formados a partir de uma única célula (Haccius 1978) ou multicelular quando um grupo de células dá origem ao embrião (Raghavan 1979).

Métodos histoquímicos têm permitido o monitoramento da mobilização e sínteses de compostos de reserva durante o desenvolvimento embriogênico possibilitando o reconhecimento de regiões e/ou tecidos de alta demanda energética (Cangahuala-Inocente et al 2009; Rocha et al 2012).

Gene marcador *SERK*

A embriogênese somática tem sido relatada para um grande número de angiospermas e gimnospermas, e serve como ferramenta para estudos relacionados ao desenvolvimento do embrião em plantas (Zimmerman 1993). Sabe-se que as células competentes são responsivas a uma série de condições que darão origem ao desenvolvimento em padrão embriogênico. Entre estas condições, podemos incluir alterações dos níveis de auxina (exógenos e/ou endógenos), assim como fatores de estresse (Fehér 2005).

As respostas celulares às condições de estresse de plantas cultivadas *in vitro* dependem do nível de estresse e do estado fisiológico das células. Quando o nível do estresse excede a tolerância celular as células podem senescer e, de forma contrária, os níveis baixos ou médios de estresse podem aumentar o metabolismo e induzir mecanismos de adaptação (Lichtenthaler 1998). Entre os mecanismos de adaptação incluí-se a reprogramação de expressão gênica, assim como mudanças celulares fisiológicas e metabólicas (Fehér et al 2003).

O processo de aquisição da competência embriogênica de células somáticas envolve a reprogramação dos padrões da expressão gênica, bem como alterações na morfologia, fisiologia e metabolismo celular (Zimmerman 1993; Suprasanna e Sidha 2013). Análise de mudanças no padrão de expressão gênica em *Arabidopsis* em resposta ao tratamento com 1 μ M de 2,4-D; demonstraram que 148 genes aumentaram sua transcrição, enquanto 85 genes diminuíram a transcrição em resposta a este tratamento, destacando, o campo de ação do 2,4-D. Entre os genes afetados pela ação deste regulador de crescimento, há aqueles envolvidos na transcrição, no metabolismo, na transdução de sinais, na comunicação intercelular, na codificação de proteínas, no transporte celular e na interação com o ambiente celular (Fehér 2005).

Por sua vez, a embriogênese somática é uma técnica adequada que permite o estudo de aspectos moleculares envolvidos na aquisição de competência embriogênica pelas células somáticas. Ao longo dos anos foi alcançado grande progresso na área de biologia molecular da embriogênese somática, contribuindo para a compreensão da interação complexa, que existe entre a indução e a expressão embriogênica. Estudos moleculares e genéticos, focados no desenvolvimento das plantas, identificaram vários grupos de genes que estão associados à aquisição e aumento da competência embriogênica. Entre os genes marcadores envolvidos na transição das células somáticas para embriogênicas tem-se: *SERKs*, *BBM* e *LECs* (Rocha e Dornelas 2013):

O gene *SERK* encontra-se dentre os mais estudados envolvidos na rota de transdução de sinais que governam a embriogênese somática e zigótica. Foi isolado pela primeira vez através de um “screening” diferencial entre culturas embriogênicas e não embriogênicas de cenoura (*Daucus carota*), foi correlacionado qualitativa e quantitativamente com a presença de células competentes à embriogênese (Schmidt et al 1997).

O gene *SERK* faz parte de uma família multigênica de receptores de proteínas do tipo quinase (RLK-Receptor-like kinase), que compreendem proteínas integrais de membrana com três domínios característicos: domínio extracelular, domínio transmembranar e domínio quinase (Smertenko e Bozhkov 2014). No domínio extracelular estão presentes um peptídeo sinal, um zíper de leucina, cinco regiões ricas em leucina (apenas *SERK* tem 5 regiões, sendo esse número variável nos diferentes receptores) e um

domínio rico em prolina, exclusivo de proteínas SERK. Há ainda na sequência da proteína um domínio transmembrana, um domínio quinase intracelular constituído de onze subdomínios, seguido da extremidade carboxi-terminal (Schmidt et al 1997; Hecht et al 2001). Entre os genes *SERKs* o mais estudado é o *AtSERK1* de *Arabidopsis*, sendo que já foram identificados mais quatro genes *SERKs* nessa espécie (*AtSERK 2-5*), com base na similaridade com *AtSERK1* (Baudino et al 2001).

A expressão de homólogos de *SERK* foi observado desde o início da embriogênese somática até o estágio globular em algumas espécies (Somleva et al 2000; Hecht et al 2001) ou até a o estágio cordiforme em outras (Schmidt et al 1997; Somleva et al 2000; Salaj et al 2008).

Desde então, estudos de expressão de genes da família *SERK* vêm sendo desenvolvidos com diversas espécies como *Zea mays* (Baudino et al 2001), *Medicago truncatula* (Nolan et al 2003; Nolan et al 2009; Wang et al 2011), *Theobroma cacao* (Santos et al 2005), *Cocos nucifera* (Pérez-Núñez et al 2009), *Rosa canina* (Kedong et al 2011), *Araucaria angustifolia* (Steiner et al 2012), *Prunus incisa* (Thunb.) (Ben Mahmoud et al 2013), dentre outras. Esses estudos demonstram a possibilidade de uso desse gene como marcador de embriogênese somática.

REFERÊNCIAS

- Agrianual (2009) AGRIANUAL Flores. 236.
- Almeida WAB, Mourão Filho FAAW, Mendes BMJ, Rodriguez APM (2006) Histological characterization of *in vitro* adventitious organogenesis in *Citrus sinensis*. Biol Plant 50:321–325. doi: 10.1007/s10535-006-0044-y.
- Alves L. M. C (2012) Produção e pós-colheita de lisianthus cultivado em ambiente protegido. 50p. Universidade Federal de Viçosa.
- Amasino RM (2005) Vernalization and flowering time. Curr Opin Biotechnol 16:154–158. doi: 10.1016/j.copbio.2005.02.004
- Amoo SO, Finnie JF, Van Staden J (2010) The role of meta-topolins in alleviating micropropagation problems. Plant Growth Regul 63:197–206. doi: 10.1007/s10725-010-9504-7
- Arnhold E (2014) Easyanova: Analysis of variance and other important complementary analyzes. R package version 4.0.
- Barrueto Cid LP, Teixeira J (2006) Indução de organogênese em lisianthus, *Eustoma grandiflorum*, a partir de fragmentos foliares cultivados *in vitro*. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF
- Baudino S, Hansen S, Brettschneider R, et al (2001) Molecular characterisation of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the SERK gene family. Planta 213:1–10. doi: 10.1007/s004250000471
- Ben Mahmoud K, Delporte F, Muhovski Y, et al (2013) Expression of *PiABP19*, *Picdc2* and *PiSERK3* during induction of somatic embryogenesis in leaflets of *Prunus incisa* (Thunb.). Mol Biol Rep 40:1569–1577. doi: 10.1007/s11033-012-2205-8
- Blázquez MA (2000) Flower development pathways. J Cell Sci 113:3547–3548.
- Brown DCW, Finstad K 1., Watson EM (1995) Somatic Embryogenesis in Herbaceous Dicots. In: Thorpe TA (org) In Vitro Embryogenesis in Plants, 1º edn. Springer Netherlands, Dordrecht, p 345–416
- Tombolato AF, Costa AMM (1998) Micropropagação de plantas ornamentais. Boletim Técnico N. 174:72. Instituto Agrônômico, Campinas-SP.
- Cangahuala-Inocente GC, Steiner N, Maldonado SB, Guerra MP (2009) Patterns of protein and carbohydrate accumulation during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana*. Pesqui Agropecuária Bras 44:217–224. doi: 10.1590/S0100-204X2009000300001

- Cave RL, Johnston ME (2010) Vernalization promotes flowering of a heat tolerant *Calandrinia* while long days replace vernalization for early flowering of *Brunonia*. *Sci Hortic* (Amsterdam) 123:379–384. doi: 10.1016/j.scienta.2009.10.004
- Choi Y-E, Yang D-C, Yoon E-S, Choi K-T (1999) High-efficiency plant production via direct somatic single embryogenesis from preplasmolysed cotyledons of *Panax ginseng* and possible dormancy of somatic embryos. *Plant Cell Rep* 18:493–499. doi: 10.1007/s002990050610
- Chouard P (1960) Vernalization and its Relations to Dormancy. *Annu Rev Plant Physiol* 11:191–238. doi: 10.1146/annurev.pp.11.060160.001203
- Colby SM, Juncosa AM, Stamp JA, Meredith CP (1991) Developmental anatomy of direct shoot organogenesis from leaf petioles of *Vitis vinifera* (Vitaceae). *Am J Bot* 78:260–269. doi: 10.2307/2445249.
- Cooper PI (1969) The absorption of radiation in solar stills. *Sol Energy* 12:333–346. doi: 10.1016/0038-092X(69)90047-4
- Costantin EC (2014) Diagnóstico da produção de lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) de corte no distrito federal. 37p. Universidade de Brasília.
- Crouch ML (1982) Non-zygotic embryos of *Brassica napus* L. contain embryo-specific storage proteins. *Planta* 156:520–524. doi:10.1007/BF00392774.
- Cuenca B, Vieitez A (1999) Histological study of *in vitro* development of adventitious buds on leaf explants of oriental beech (*Fagus orientalis* Lipsky). *In Vitro Cell Dev Biol* 35:326–332. doi: 10.1007/s11627-999-0043-8.
- Dally N, Jung C, Blu M (2015) ScienceDirect Flowering time regulation in crops — what did we learn from Arabidopsis? *Curr Opin Biotechnol* 32:121–129. doi: 10.1016/j.copbio.2014.11.023
- Dennis ES, Peacock WJ (2007) Epigenetic regulation of flowering. *Curr Opin Plant Biol* 10:520–527. doi: 10.1016/j.pbi.2007.06.009
- Dole JM, Wilkins HF (2005a) *Eustoma*. Floriculture: Principles and Species. 2^o edn. Pearson Prentice Hall, New Jersey, p 514–521
- Dole JM, Wilkins HF (2005b) Plant growth regulation. Floriculture: Principles and Species. 2^o edn. PEARSON Prentice Hall, New Jersey, p 141–161
- Elmeer SKE (2013) Factors Regulating Somatic Embryogenesis in Plants. In: Aslam J, Srivastava PS, Sharma MP (orgs) *Somatic Embryogenesis and Gene Expression*. Narosa, India, p 56–81

- Fehér A (2005) Why somatic plant cells start to form embryos? Plant Cell Monogr 2:85–101. doi: 10.1007/7089_019
- Fehér A (2008) The initiation phase of somatic embryogenesis: What we know and what we don't. Acta Biol Szeged 52:53–56.
- Fehér A, Pasternak TP, Dudits D (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. Plant Cell Tissue Organ Cult 74:201–228. doi: 10.1023/A:1024033216561
- Ferreira EB, Cavalcanti PP, Nogueira DA (2013) ExpDes: Experimental Desings package versão 1.1.2.
- Fischer C, Neuhaus G (1996) Influence of auxin on the establishment of bilateral symmetry in monocots. Plant J 9:659–669. doi: 10.1046/j.1365-313X.1996.9050659.x
- Fujimura T, Komamine A (1980) Mode of Action of 2,4-D and Zeatin on Somatic Embryogenesis in a Carrot Cell Suspension Culture. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 99:1–8. doi: 10.1016/S0044-328X(80)80106-1
- Fukuda BY, Kiyoshi F, Ohkawa R, et al (1994) Classification of *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn . Cultivars on Rosette Characteristics Ratios. J Japanese Soc Hortic Sci 62:845–856.
- Furukawa H, Matsubara C, Shigematsu N (1990) Shoot regeneration from the roots of prairie gentian (*Eustoma grandiflorum* (Griseb.) SCHINNERS). Plant Tissue Cult Lett 7:11–13.
- Gahan PB, George EF (2008) Adventitious Regeneration. In: George EF, Hall MA, Klerk G-J De (orgs) Plant Propagation by Tissue Culture, 3ra. edn. Springer Netherlands, Dordrecht, p 355–402
- Gaj MD (2004) Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Plant Growth Regul 43:27–47. doi: 10.1023/B:GROW.0000038275.29262.fb
- Gruszynski C (2007) Informações básicas para o cultivo comercial do Lisianto ou *Eustoma* para corte. ASCAR/EMATER, Gramado - RS
- Guerra MP, Torres AC, Teixeira JB (1998) Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JA (orgs) Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas, 2º edn. Embrapa-CBAB, Brasília, DF, p 533–568
- Ha TM (2014) A Review of Plants' Flowering Physiology: The Control of Floral Induction by Juvenility, Temperature and Photoperiod in Annual and Ornamental Crops. Asian J Agric Food Sci 02:186–195.

- Ha TM, Johnston ME (2013) The Effect of Low Temperature on Flowering of *Rhodanthe Floribunda*. Asian J Agric Food Sci 1:205–209. doi: 10.1098/rspb.1925.0046
- Haccius B (1978) Question of unicellular origin of non–zygotic embryos in callus cultures. Phytomorphology 373–385.
- Halevy AH, Kofranek AM (1984) Evaluation of Lisianthus as a new flower crop. HortScience 19:845 – 847.
- Hamo ML, Villacorta C, Zaccai M (2015) Characterization of expressed sequence tags from *Lilium longiflorum* in vernalized and non-vernalized bulbs. J Plant Physiol 173:72–81. doi: 10.1016/j.jplph.2014.09.015
- Harbaugh BK (1995) Flowering of *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn. Cultivars influenced by photoperiod and temperature. HortScience 30:1375–1377.
- Harbaugh BK (2007) Lisianthus *Eustoma grandiflorum*. In: Neil O. A (org) Flower breeding and genetics issues, challenges and opportunities for the 21st century, 1^o edn. Springer, Netherlands, p 645–663
- Harbaugh BK, Roh MS (1992) Rosetting of lisianthus cultivars exposed to high temperature. HortScience 27:885–887.
- Harbaugh BK, Scott JW (2003) “Maurine Twilight” and “Maurine Daylight” – heat-tolerant lisianthus with bi-colored flowers. HortScience 31:131–132.
- Harbaugh BK, Scott JW (1999) “Florida Pink” and “Florida Light Blue”-Semi-dwarf Heat-tolerant Cultivars of Lisianthus. HortScience 34:364–365.
- Hartmann HT, Kester DE, Davies JFT, Geneve RL (2002) Principles of Tissue Culture and Micropropagation. In: Hartmann HT, Kester DE (orgs) Plant Propagation: Principles and Practices, 7^o edn. Prentice Hall, p 639–689
- Hecht V, Vielle-Calzada JP, Hartog M V, et al (2001) The Arabidopsis *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1* Gene Is Expressed in Developing Ovules and Embryos and Enhances Embryogenic Competence in Culture. Plant Physiol 127:803–816. doi: 10.1104/pp.010324.In
- Hisamatsu T, Koshioka M, Mander LN (2004) Regulation of gibberellin biosynthesis and stem elongation by low temperature in *Eustoma grandiflorum*. J Hortic Sci Biotechnol 79:354–359.
- Hisamatsu T, Koshioka M, Oyama N, Mander LN (1999) The relationship between endogenous gibberellins and rosetting in *Eustoma grandiflorum*. J Japanese Soc Hortic Sci 68:527–533.

- Ibraflor (2013) IBRAFLOR – Release Impresa. 000:1.
- Jiménez VM (2005) Involvement of Plant Hormones and Plant Growth Regulators on *in vitro* Somatic Embryogenesis. *Plant Growth Regul* 47:91–110. doi: 10.1007/s10725-005-3478-x
- Jiménez VM (2001) Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. *Rev Bras Fisiol Veg* 13:196–223. doi: 10.1590/S0103-31312001000200008
- Jiménez V.M., Thomas C. (2005) Participation of plant hormones in determination and progression of somatic embryogenesis. *Plant Cell Monogr.* 2, 103–118. doi:10.1007/7089_034
- Junghans TG, Santos-Serejo JA (2006) Obtenção e Manuseio de Explantes. In: Souza AS, Junghans TG (orgs) *Introdução à Micropropagação Plantas*. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA, p 141–153
- Kageyama Y, Fukushima Y, Konishi K (1990) Effects of raising seedling at cool temperature and chilling treatment of seed on rosette formation of *Eustoma*. *J Jpn Soc Hort* 59:496–497.
- Karami O, Aghavaresi B, Mahmoudi A (2009) Molecular aspects of somatic-to-embryogenic transition in plants. *J Chem Biol* 2:177–90. doi: 10.1007/s12154-009-0028-4
- Kedong X, Qinglin L, Huifang Y, et al (2011) Isolation and molecular characterization of *RcSERK1*: A *Rosa canina* gene transcriptionally induced during initiation of protocorm-like bodies. *J Biotechnol* 10:4011–4017. doi: 10.5897/AJB10.1520
- Kim D-H, Doyle MR, Sung S, Amasino RM (2009) Vernalization: winter and the timing of flowering in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25:277–299. doi: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113411
- Kobori M (2012) *Produção de Lisianthus de corte*. 13p. Sakata, Atibaia–SP.
- Lichtenthaler HK (1998) The Stress Concept in Plants: An Introduction. *Ann New York Acad Sci* 851:187–198.
- Liu C, Xu Z, Chua N (1993) Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *Plant Cell Online* 5:621–630.
- Lorenzi H, Moreira de Souza H (2008) *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn. In: Lorenzi H, Moreira de Souza H (orgs) *Plantas Ornamentais no Brasil*, 4^o edn. Plantarum, São Paulo, p 615

- Michaels SD, Amasino RM (2000) Memories of winter: Vernalization and the competence to flower. *Plant, Cell Environ* 23:1145–1153. doi: 10.1046/j.1365-3040.2000.00643.x
- Moshkov IE, Novikova GV, Hall MA, George EF (2008) Plant Growth Regulators III: Gibberellins, Ethylene, Absciscic Acid, their Analogues and Inhibitors; Miscellaneous Compounds. In: George EF, Hall MA, Klerk G-J De (orgs) *Plant Propagation by Tissue Culture*, 3ra edn. Springer Netherlands, p 227–282
- Moura EF, Ventrella MC, Motoike SY, et al (2008) Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius). *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 95:175–184. doi: 10.1007/s11240-008-9430-9
- Moura EF, Ventrella MC, Motoike SY (2010) Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (*Arecaceae*). *Sci Agric* 67:399–407. doi: 10.1590/S0103-90162010000400004
- Nakano Y, Kawashima H, Kinoshita T, et al (2011) Characterization of FLC, SOC1 and FT homologs in *Eustoma grandiflorum*: effects of vernalization and post-vernalization conditions on flowering and gene expression. *Physiol Plant* 141:383–93. doi: 10.1111/j.1399-3054.2011.01447.x
- Namasivayam P (2007) Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 90:1–8. doi: 10.1007/s11240-007-9249-9
- Nolan KE, Irwanto RR, Rose RJ (2003) Auxin Up-Regulates *MtSERK1* Expression in Both *Medicago truncatula* Root-Forming and Embryogenic Cultures. *Plant Physiol* 133:218–230. doi: 10.1104/pp.103.020917.218
- Nolan KE, Kurdyukov S, Rose RJ (2009) Expression of the *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1* (*SERK1*) gene is associated with developmental change in the life cycle of the model legume *Medicago truncatula*. *J Exp Bot* 60:1759–71. doi: 10.1093/jxb/erp046
- Ohkawa K, Kano A, Kanematsu K, Korenaga M (1991) Effects of air temperature and time on rosette formation in seedlings of *Eustoma grandiflorum*. *Sci Agric* 48:171–176.
- Ohkawa K, Korenaga M, Yoshizumi T (1993) Influence of temperature prior to seed ripening and at germination on rosette formation and bolting of *Eustoma grandiflorum*. *Sci Hortic (Amsterdam)* 53:225–230.
- Ohkawa K, Yoshizumi T, Korenaga M, Kanematsu K (1994) Reversal of Heat-induced Resetting in *Eustoma grandiflorum* with Low Temperatures. *HortScience* 29:165–166.

- Oka M, Tasaka Y, Iwabuchi M, Mino M (2001) Elevated sensitivity to gibberellin by vernalization in the vegetative rosette plants of *Eustoma grandiflorum* and *Arabidopsis thaliana*. Plant Sci 160:1237–1245. doi: 10.1016/S0168-9452(01)00388-0
- Otoni WC, Paim-Pinto Lopes D, Rocha DI, et al (2013) Organogenesis and somatic embryogenesis in passionfruit (*Passiflora* sp.). In: Aslam J, Srivastava PS, Sharma MP (orgs) Somatic embryogenesis and gene expression. Narosa, India, p 1–17
- Pasternak TP, Prinsen E, Ayaydin F, et al (2002) The Role of Auxin, pH, and Stress in the Activation of Embryogenic Cell Division in Leaf Protoplast Derived Cells of Alfalfa. Plant Physiol 129:1807–1819. doi: 10.1104/pp.000810.1
- Peres LEP (2002) Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento 25:44–48.
- Pérez-Núñez MT, Souza R, Sáenz L, et al (2009) Detection of a *SERK*-like gene in coconut and analysis of its expression during the formation of embryogenic callus and somatic embryos. Plant Cell Rep 28:11–19. doi: 10.1007/s00299-008-0616-8
- Pergola G (1992) The need for vernalization in *Eustoma russellianum*. Sci Hortic (Amsterdam) 51:123–127.
- Pergola G, Oggiano N, Curir P (1992) Effects of seeds and seedlings temperature conditioning on planting, bolting and flowering in *Eustoma russellianum*. Acta Hortic 314:173–177.
- Pivonia S, Levita R, Dori I (2010) Application of mycorrhizae to ornamental horticultural crops: lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) as a test case. Spanish J Agric Res 8:5–10.
- Portugal Pinto de Carvalho AC, Caetano Tombolato AF, de Jesus Rodrigues AA, et al (2009) Panorama da Micropropagação no Brasil com Ênfase em Flores e Plantas Ornamentais. In: Junghans T, da Silva Souza A (orgs) Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas - BA, p 13–42
- Prakash J, Nagar RG (2009) Micropropagation of Ornamental Perennials : Progress and Problems. 289–294.
- R Core Team (2014) Software R: A language and environment for statistical computing versão 3.0.3.
- Raghavan V (1979) Adventive embryogenesis: induction of diploid embryoids. Experimental embryogenesis in vascular plants. Academic, London, p 349–381
- Read PE, Preece JE (2009) Micropropagation of ornamentals: The wave of the future? Acta Hortic 812:51–62.

- Redenbaugh K, Fujii J, Slade D, et al (1991) Artificial Seeds - Encapsulated Somatic Embryos. In: Bajaj YPS (org) High-Tech and Micropropagation I. I. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, p 398–416
- Redenbaugh K, Paasch BD, Nichol JW, et al (1986) Somatic seeds: encapsulation of asexual plant embryos. *Bio/Technology* 4:797–801. doi: 10.1038/nbt0986-797
- Rocha DI, Dornelas MC (2013) Molecular overview on plant somatic embryogenesis. *CAB Rev* 8:17. doi: 10.1079/PAVSNNR20138022
- Rocha DI, Vieira LM, Tanaka FAO, da Silva LC, Otoni WC (2012) Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. *Protoplasma* 249:747–58. doi: 10.1007/s00709-011-0318-x
- Roh M, Halevy AH, Wilkins HF (1989) *Eustoma grandiflorum*. In: A.H. Halevy (org) The Handbook of Flowering. p 322–327
- Runkle ES, Heins RD, Cameron AC, Carlson WH (1999) Cold treatment modifies the photoperiodic flowering response of *Lobelia x speciosa*. *Sci Hortic (Amsterdam)* 80:247–258. doi: 10.1016/S0304-4238(98)00249-0
- Sakata (2010) Sakata's reliable seeds Flower seed catalogue. 103. Yokohama - Japan
- Salaj J, von Recklinghausen IR, Hecht V, et al (2008) *AtSERK1* expression precedes and coincides with early somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem* 46:709–714. doi: 10.1016/j.plaphy.2008.04.011
- Salisbury FB, Ross CW (1992a) Photoperiodism. *Plant physiology*, 4a. edn. Wadsworth, California, p 504–530
- Salisbury FB, Ross CW (1992b) Growth responses to temperature. *Plant physiology*, 4a. edn. Wiley-Blackwell, California, p 485–503
- Santos M, Romano E, Yotoko KSC, et al (2005) Characterisation of the cacao *somatic embryogenesis receptor-like kinase (SERK)* gene expressed during somatic embryogenesis. *Plant Sci* 168:723–729. doi: 10.1016/j.plantsci.2004.10.004
- Schiavone FM, Cooke TJ (1987) Unusual patterns of somatic embryogenesis in the domesticated carrot: developmental effects of exogenous auxins and auxin transport inhibitors. *Cell Differ* 21:53–62. doi: 10.1016/0045-6039(87)90448-9
- Schmidt ED, Guzzo F, Toonen MA, de Vries SC (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development* 124:2049–2062.

- Shang HH, Liu CL, Zhang CJ, et al (2009) Histological and ultrastructural observation reveals significant cellular differences between *Agrobacterium* transformed embryogenic and non-embryogenic calli of Cotton. J Integr Plant Biol 51:456–465. doi: 10.1111/j.1744- 7909.2009.00824.x
- Silva, C.V., Oliveira, L.S., Lariato, V.A.P., Silva, L.C., Campos, J.M.S., Viccini, L.F., Oliveira, E.J., Otoni, W.C., 2011. Organogenesis from root explants of commercial populations of *Passiflora edulis* Sims and a wild passionfruit species, *P. cincinnata* Masters. Plant Cell, Tissue Organ Cult. 107, 407–416. doi:10.1007/s11240-011-9991-x
- Smertenko A, Bozhkov P (2014) The life and death signalling underlying cell fate determination during somatic embryogenesis. In: Nick P, Opatrny Z (orgs) Applied Plant Cell Biology: Cellular Tools and Approaches for Plant Biotechnology. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, p 131–178
- Solís-Ramos LY, Nahuath-Dzib S, Andrade-Torres A, et al (2010) Indirect somatic embryogenesis and morphohistological analysis in *Capsicum chinense*. Biologia (Bratisl) 65:504–511. doi: 10.2478/s11756-010-0049-z
- Somleva MN, Schmidt EDL, de Vries SC (2000) Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by SERK expression. Plant Cell Rep 19:718–726. doi: 10.1007/s002999900169
- Souza O. J (2011) Diagnóstico da produção de hortênsia (*Hydrangea macrophylla* Serv.) na propriedade Hortência & Cia de Brasília. 44p. Universidade de Brasília.
- Staden J, Zazimalova E, George EF (2008) Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists. In: George EF, Hall MA, Klerk G-J De (orgs) Plant Propagation by Tissue Culture, 3ra. edn. Springer Netherlands, p 205–226
- Steiner N, Santa-Catarina C, Guerra MP, et al (2012) A gymnosperm homolog of SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE-1 (*SERK1*) is expressed during somatic embryogenesis. Plant Cell Tissue Organ Cult 109:41–50. doi: 10.1007/s11240-011-0071-z
- Suprasanna P, Sidha M (2013) Somatic Embryogenesis Receptor Kinase (*SERK*) and regulation of embryogenesis in plants. In: Aslam J, Srivastava PS, Sharma MP (orgs) Somatic Embryogenesis and Gene Expression, 1^o edn. Narosa, India, p 188–200
- Taiz L, Zeiger E (2013a) Controle do florescimento. Fisiologia vegetal, 5a. edn. Artmed, New Jersey, p 715–752
- Taiz L, Zeiger E (2004) Células Vegetais. Fisiologia Vegetal, 3^o edn. Artmed, Porto Alegre, p 29–55

- Takeno K, Koshioka M, Pharis RP, et al (2006) Endogenous Gibberellin-Like Substances in Somatic Embryos of Grape (*Vitis vinifera* x *Vitis rupestris*) in Relation to Embryogenesis and the Chilling Requirement for Subsequent Development of Mature Embryos. *Plant Physiol* 73:803–808. doi: 10.1104/pp.73.3.803
- Tanigawa T, Kobayashi Y, Matsui H, Kunitake T (2001) effects of seedling age and high and low growth temperatures on bolting of *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn. Cultivars. *J Japanese Soc Hortic Sci* 70:501–509.
- Tanigawa T, Kuroyanagi N, Kunitake T (2002) Effects of low temperature treatment of imbibed seeds of *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn. on their germination and subsequent bolting. *J Japanese Soc Hortic Sci* 71:697–701.
- Torrey JG (1966) The initiation of organized development in plants. *Adv Morphog* 5:39–91.
- Vasil IK (1994) Automation of plant propagation. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 39:105–108. doi: 10.1007/BF00033917
- Von Arnold S (2008) Somatic Embryogenesis. In: George EF, Hall MA, Klerk G-J De (orgs) *Plant Propagation by Tissue Culture*, 3rd edn. Springer Netherlands, p 335–354
- Wang XD, Nolan KE, Irwanto RR, et al (2011) Ontogeny of embryogenic callus in *Medicago truncatula*: The fate of the pluripotent and totipotent stem cells. *Ann Bot* 107:599–609. doi: 10.1093/aob/mcq269
- Xavier A, Wendling I, Silva RL da (2009) Propagação *in vitro* de Espécies Florestais. In: Xavier A, Wendling I, Silva RL da (orgs) *Silvicultura clonal*, 1º edn. Editora UFV, Viçosa, p 152–209
- Xi-heng Z, Jin-cai LI, Yasuyo N (2011) Effects of Low Temperature Vernalization Treatment of Seeds of *Lisianthus* on Bolting. *Acta Agric Boreali-Sinica* 3:10503.
- Yang X, Zhang X (2010) Regulation of Somatic Embryogenesis in Higher Plants. *CRC Crit Rev Plant Sci* 29:37–57. doi: 10.1080/07352680903436291
- Yeung EC (1995) Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: Thorpe TA (org) *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Press, Canada, p 205–248
- Zaccari M, Edri N (2002) Floral transition in *Lisianthus* (*Eustoma grandiflorum*). *Sci Hortic* 95:333–340.
- Zavattieri MA, Frederico AM, Lima M, et al (2010) Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. *Electron J Biotechnol* 13:1–9. doi: 10.2225/vol13-issue1-fulltext-4

- Zimmerman JL (1993) Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. *Plant Cell* 5:1411–1423. doi: 10.1105/tpc.5.10.1411
- Zimmermann MJ (2010) Embriogênese somática. In: Cid Barreto LP (org) *Cultivo in vitro* de plantas. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF, p 67–101
- Zlenko VA, Kotikov I V, Troshin LP (2002) Efficient GA₃-assisted plant regeneration from cell suspensions of three grape genotypes via somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 70:295–299. doi: 10.1023/A:1016593227463

CAPÍTULO 1: EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE LISIANTHUS (*Eustoma grandiflorum*) A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES: CARACTERIZAÇÃO MORFO-ANATÔMICA, HISTOQUÍMICA E EXPRESSÃO DO GENE *SERK*

RESUMO - Na embriogênese somática é essencial o entendimento dos mecanismos que atuam na transição de células somáticas para embriogênicas, além da determinação da origem celular e dos grupos celulares envolvidos na regeneração, tanto para o desenvolvimento de protocolos eficientes quanto para a validação do uso da embriogênese somática em programas de melhoramento e na transformação genética. Objetivou-se propor um protocolo eficiente de embriogênese somática a partir de explantes foliares de *E. grandiflorum*, comprovado por análise histológicas e moleculares nas diferentes fases das culturas embriogênicas. Após os estudos realizados, recomenda-se o uso de 10 µM de 2,4-D na fase de indução com permanência de 30 d neste meio de cultivo. Para a fase de diferenciação e maturação de embriões somáticos, recomenda-se o uso de 2 µM de BA no meio; no entanto, o uso de *mT* pode ser uma alternativa adequada nesta fase. Foi demonstrado que a combinação de auxina e citocininas e o tempo de permanência durante a indução de embriogênese somática mantiveram os níveis de ploidia da espécie. Os estudos anatômicos realizados comprovaram que a origem de calos embriogênicos está associada às intensas divisões anticlinais de células perivasculares e do mesofilo. Após a transferência dos embriões somáticos para o meio de diferenciação e maturação observou-se germinação assincrônica e regeneração de vitroplantas. Os compostos de reserva nas células dos explantes foliares inicialmente cumprem função estrutural nos tecidos. Porém, ao longo do processo de embriogênese somática houve variação aparente nas concentrações de amido, polissacarídeos, substâncias pécticas e proteínas totais. O sinal de expressão de *SERK* somente foi observado como início das divisões células e estendeu-se ao longo do desenvolvimento embriogênico até o estágio globular dos embriões somáticos. Assim, sugere-se que a aquisição de competência embriogênica pelas células somáticas na embriogênese em segmentos foliares esteja sinalizada pelo uso de 2,4-D no meio de cultivo e que a expressão de *EgSERK-like* possa ser utilizada para monitorar a transição de células competentes em células e tecidos embriogênicos.

Palavras-chave: Embriogênese somática, explantes foliares, hibridização *in situ*, filogenia.

SOMATIC EMBRYOGENESIS OF LYSIANTHUS (*Eustoma grandiflorum*) FROM LEAF EXPLANTS: MORPHO-ANATOMICAL HISTOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND SERK GENE EXPRESSION

ABSTRACT - During somatic embryogenesis it is essential to understand the basic mechanisms leading the transition from somatic to embryogenic cells, and to determine the cellular origin and cellular groups involved in regeneration. This knowledge will be useful for the development of efficient protocols and the validation of using somatic embryogenesis in breeding programs and genetic transformation. This work aims to develop an efficient protocol of somatic embryogenesis from leaf explants of *Eustoma grandiflorum*, by studying the cytological and molecular changes at different stages of embryogenic cultures. Our results suggest the use of 10 μ M of 2,4-D for the period of 30 days in the culture medium for the induction phase. For the differentiation and maturation phase of somatic embryos we recommend to use 2 μ M BA. We also show that the combination of auxin and cytokinins and the culture period used did not alter the ploidy levels of the regenerants. The anatomical studies performed showed that the origin of somatic embryogenesis is associated with intense anticlinal divisions of perivascular and mesophyll cells. We observed asynchronous germination after transferring the somatic embryos to the differentiation and maturation medium. The storage compounds in the cells of leaf explants initially played a structural role in the tissues. However, during the somatic embryogenesis process there were changes in the concentration of starch, polysaccharides, pectins and total protein. The *in situ* hybridization signal of *SERK* gene expression was detected in early cell divisions and extended along the embryogenic development to the globular stage of the somatic embryos. Our results suggest that the embryogenic competence of somatic cells during somatic embryogenesis from leaf tissues is achieved by the addition of 2,4-D, that *EgSERK*-like expression can be used to monitor the transition of competent cells in embryogenic cells and tissues.

Keywords: Leaf explants, somatic embryogenesis, *in situ* hybridization, phylogeny.

INTRODUÇÃO

O lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) é uma espécie herbácea bienal da família *Gentianaceae*, cultivada como anual, de caule ereto, folhas ovais e oblongas, formando com as flores um grande atrativo ornamental. É originário do norte do México e sul dos Estados Unidos da América, podendo ser cultivado tanto como flor-de-corte quanto plantas de vaso (Dole e Wilkins 2005).

A aceitação dessa espécie no mercado de flores foi potencializada pelo trabalho de melhoramento genético realizado em características como: tolerância das plantas às temperaturas elevadas e às doenças; germinação das sementes e vigor das mudas; uniformidade de floração; e vida pós-colheita das flores (Harbaugh e Scott 2003; Harbaugh 2007; Dole e Wilkins 2005), dentre outras.

Esta espécie pode ser propagada de forma sexuada e assexuada. Dentre as formas de propagação, destaca-se a propagação *in vitro*, sendo importante estratégia para o melhoramento vegetal, clonagem e multiplicação de *E. grandiflorum* em larga escala e para a obtenção de plantas com elevada qualidade fitossanitária e genética (Barrueto Cid e Teixeira 2006; Kaviani 2014). Dentre as duas vias morfogênicas *in vitro*, a embriogênese somática e a organogênese, primeira caracteriza-se pela formação de uma estrutura bipolar, na qual são formados os meristemas apical e radicular num único eixo, temporalmente sincronizados. Os embriões somáticos desenvolvem-se através de uma única célula ou de um grupo de células somáticas e podem ser induzidos de forma direta ou indireta através da formação de calos (Karami et al. 2009; Rocha e Dornelas 2013; Rocha et al. 2014).

As fases de indução, diferenciação e maturação da embriogênese somática dependem das condições de cultivo, do genótipo (cultivar/espécie), do tipo de explante, do estágio de desenvolvimento e dos níveis endógenos de fito-hormônios da planta matriz (Namasivayam 2007), sendo fundamental para a indução e maturação da embriogênese somática em algumas espécies (Gaj 2004; Zavattieri et al. 2010). Entre os reguladores de crescimento, as auxinas são reconhecidas como essenciais na indução da embriogênese, sendo consideradas como um dos principais substâncias envolvidos na aquisição da competência embriogênica das células somáticas (Fujimura e Komamine 1980; Pasternak et al. 2002). Dentre as auxinas, o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é o mais utilizado para a indução da embriogênese somática de forma isolada ou em combinação com outros

reguladores de crescimento (Gaj 2004). Uma vez que os embriões somáticos atingirem o tamanho ideal, é necessário trocá-los de meio de cultivo, para permitir o desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular, assim juntamente com a demanda de auxinas, ressalta-se a importância da presença de citocininas no meio de cultivo; geralmente faz-se necessária a alternância entre estes reguladores de crescimento para o sucesso da embriogênese somática (Zimmermann 2010).

A composição e a concentração relativa do regulador de crescimento utilizada no meio de cultivo determinarão a responsividade do explante, assim como a rota morfogênica (Gaj 2004). Além disso, o período de permanência do material na fase de indução é crucial, uma vez que um período extenso no meio de indução suplementado com auxina pode levar à paralisação do desenvolvimento embriogênico e da perda do potencial embriogênico do material. Sendo assim, o uso prolongado de 2,4-D pode ser o responsável por variações genéticas e epigenéticas nas culturas (Von Arnold 2008).

A manipulação dos explantes em meios de cultura pode acarretar em variações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares, ditos distúrbios, que podem ser úteis ou indesejáveis dependendo do objetivo do trabalho (Neelakandan e Wang 2012). As mudanças morfológicas e as alterações cromossômicas, como por exemplo, aumento no nível de ploidia, são as variações genéticas mais observadas na cultura de tecidos (Jain 2001). Existem vários métodos para detecção e monitoramento do nível de ploidia das plântulas geradas *in vitro*, sendo que a citometria de fluxo é uma das técnicas mais eficazes na identificação deste tipo de alteração (Dolezel e Bartos 2005; Orbović et al. 2007; Bairu et al. 2010; Pasqual et al. 2012).

Por outro lado, é essencial o entendimento dos mecanismos que atuam na transição de células somáticas para embriogênicas, além da determinação da origem celular e dos grupos celulares envolvidos na regeneração tanto para o desenvolvimento de protocolos eficientes (Fehér et al. 2003; Fehér 2005; Perez-Núñez et al. 2006) quanto na validação do uso da embriogênese somática em programas de transformação genética (Shang et al. 2009). Assim, estudos anatômicos têm fornecido descrições detalhadas das alterações envolvidas na aquisição de competência embriogênica e da histodiferenciação dos embriões somáticos a partir de discos foliares de *Manihot esculenta* (Stamp 1987), *Elaeis guineenses* (Schwendiman 1988), *Cichorium* (Dubois et al. 1991), *Saccharum officinarum* (Brisibe et

al. 1993), *Solanum melongena* (Tarré et al. 2004), *Cucumis anguria* (Ju et al. 2014), dentre outras. Além disso, métodos histoquímicos permitem o monitoramento da mobilização e síntese de compostos de reserva durante o desenvolvimento embriogênico, possibilitando o reconhecimento das regiões e tecidos com elevada demanda energética (Branca et al. 1994; Cangahuala-Inocente et al. 2004; Cangahuala-Inocente et al. 2009; Rocha et al. 2012).

A aquisição da competência embriogênica de células somáticas envolve a reprogramação dos padrões da expressão gênica, bem como as alterações na morfologia, fisiologia e metabolismo celular. Assim, as mudanças dependerão da regulação da expressão de genes específicos nos diferentes estádios do desenvolvimento embriogênico (Zimmerman 1993; Suprasanna e Sidha 2013), permitindo o estudo de aspectos morfo-fisiológicos e moleculares envolvidos na diferenciação celular e no desenvolvimento da embriogênese somática. Ao longo dos últimos anos foi alcançado grande progresso na área de genética molecular da embriogênese somática, sendo que vários marcadores embriogênicos foram identificados, entre eles os genes *SERK*, *BBM* e *LEC* (Rocha e Dornelas 2013).

Dentre os genes envolvidos na rota de transdução de sinais, o que governa a embriogênese e mais estudado é o *SERK* - *Somatic Embryogenesis Receptor Kinase*, caracterizado como marcador de embriogênese em *Daucus carota*, *Dactylis glomerata* e *Arabidopsis thaliana* (Schmidt et al. 1997; Somleva et al. 2000; Hecht et al. 2001). Os genes *SERK* fazem parte da super-família LRR-RLKs, os quais estão relacionados à percepção de sinais químicos do ambiente durante o crescimento e desenvolvimento da planta, sendo capazes de realizar a transdução de sinais extracelulares para o meio intracelular (Li 2010). O critério principal que distingue as proteínas *SERK* dos outros grupos RLKs é a presença do domínio SPP localizado após as sequências repetitivas de LRRs e antes do domínio transmembrana (Albrecht et al. 2008).

A caracterização da expressão de homólogos de *SERK* serve como marcador de células competentes, assim como controlador da transição de células somáticas para competentes embriogênicas, uma vez que esse gene pode ser um componente de rotas de sinalização para a embriogênese (Fehér et al. 2003). Por sua vez, a caracterização dos homólogos de *SERK* de *Zea mays* e *Dactylis glomerata* indica que este gene possui uma função conservada entre mono e eudicotiledôneas (Somleva et al. 2000).

Para *E. grandiflorum* trabalhos de embriogênese somática com o uso de explantes foliares foram propostos por Ruffoni et al. (1990) e Nhut et al. (2006), porém análises histológicas e moleculares deste processo não foram feitas até o momento. Entretanto, para o entendimento dos mecanismos envolvidos na indução, diferenciação e maturação, desde a aquisição da competência celular à embriogênese somática, são necessários estudos mais detalhados dos eventos regenerativos na espécie. Diante disso, o objetivo do trabalho foi propor um eficiente protocolo de embriogênese somática a partir de explantes foliares de *Eustoma grandiflorum*, comprovado a partir das mudanças citológicas e moleculares nas diferentes fases das culturas embriogênicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e condições de cultivo

Foram utilizados, como material vegetal, sementes de *Eustoma grandiflorum* cv. Abc 2-3 Rose, previamente desinfestadas em etanol 70 % (v/v) por 1 min, seguida por imersão em hipoclorito de sódio comercial 2,5 % (v/v) com 2 gotas de Tween-20 a 0,1 % (v/v) por 15 min. Em seguida, foi feita tríplice lavagem em água deionizada esterilizada por 5 min cada.

As sementes foram inoculadas em placas de Petri (90 x 15 mm, J. Prolab, Brasil), contendo meio de cultura constituído por sais básicos MS (Murashige e Skoog 1962) meia força, complexo vitamínico MS, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 20 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar Merck®. O pH foi ajustado para 5,7, anteriormente à autoclavagem a 121 °C e 1,5 atm. As placas de Petri foram acondicionadas em sala de crescimento sob temperatura de 27 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h e irradiância de 36 µmol m⁻² s⁻¹, fornecida por duas lâmpadas fluorescentes de 20 W (Osram® luz do dia, Brasil) durante 30 d.

Indução de calos embriogênicos

Como explantes, foram utilizados segmentos foliares quadrados (0,5 cm²) obtidos a partir do seccionamento de plântulas previamente germinadas *in vitro*. Os segmentos foliares foram inoculados com a fase adaxial voltada para cima, em meio de cultura contendo sais MS, 2 % de sacarose e suplementado com ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) ou ácido α-naftalenoacético (ANA). Com base nos resultados obtidos foi montado o experimento com segmentos foliares em meio MS suplementado com diferentes concentrações (0, 10, 20, 30 ou 40 µM) de 2,4-D. Nesta fase de indução de calos embriogênicos, o material foi mantido no escuro por 30 d em sala de crescimento, com temperatura de 27 ± 2 °C.

Diferenciação e maturação dos embriões somáticos

Para a fase de maturação dos embriões somáticos, inicialmente foi utilizado meio de cultura MS suplementado com 4 µM de 6-benzilaminopurina (BA), semelhante ao proposto por Nhut et al. (2006). Após 25 d nesse meio de cultura, embriões somáticos no estágio cotiledonar foram transferidos individualmente para tubo de ensaio contendo meio MS meia força, 2 % de sacarose durante 20 d. Em seguida, as vitroplantas foram transferidas

para tubos de ensaio com meio MS meia força, 2 % de sacarose até o completo desenvolvimento de dois a três pares de folhas verdadeiras. As plântulas desenvolvidas foram transferidas para copos plásticos (300 mL) contendo uma mistura autoclavada de Plantmax[®] HT (Eucatex, Brasil) com vermiculita (3:1). As plântulas foram cobertas com sacos transparentes de polietileno para manter a umidade elevada e colocadas em mini-estufa de vidro para aclimatização. Após duas semanas foi removida o saco de polietileno para a completa aclimatização das plantas.

O uso de 4 μ M BA permitiu a germinação, desenvolvimento dos embriões somáticos e obtenção de plantas aclimatizadas. Porém, em estudos preliminares, foram observados meristemoides (divisões celulares concêntricas – dados não mostrados) em análises estruturais das vitroplantas; provavelmente relacionadas com a adição de 4 μ M de BA ao meio de cultura. Diante disso, foi proposto a redução da concentração de BA, assim como o uso de uma alternativa à citocinina BA, sendo utilizado, em substituição, a *m*-Topolina (*mT*) adicionada ao meio de diferenciação e maturação.

Calos embriogênicos induzidos em meio MS suplementado com 10 μ M de 2,4-D a partir de explantes foliares de *E. grandiflorum* (melhor resposta obtida para a fase de indução), foram transferidos após 30, 40 ou 50 d para o meio de diferenciação e maturação composto de sais MS com 2 % de sacarose e diferentes concentrações (2 ou 4 μ M) de BA ou *mT*, além do tratamento controle s/RC. Ao longo destas fases, as culturas embriogênicas foram mantidas em sala de crescimento sob temperatura de 27 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por duas lâmpadas fluorescentes de 20 W (Osram[®] luz do dia, Brasil).

Nas fases de indução e maturação dos embriões somáticos, a captura das imagens foi realizada em fotoestereoscópio (Olympus SZX7) com câmera digital acoplada (modelo Olympus EVOLT-330).

Citometria de fluxo

Folhas de plantas regeneradas a partir da ES de *E. grandiflorum* cv. Abc 2-3 Rose induzidas com 10 μ M de 2,4-D e maturados com 2 μ M de BA foram analisadas por citometria de fluxo para avaliar o nível de ploidia de DNA. Plantas germinadas *in vitro* a partir de sementes foram utilizadas como padrão externo diploide da espécie.

Para obtenção das suspensões nucleares, foram utilizados segmentos foliares (2cm²) das amostras de acordo com o método de Galbraith et al. (1983), esses segmentos foram colocados em placas de Petri e os núcleos extraídos por *chopping* em 500 µL do tampão de lise OTTO I, a 4 °C (Otto 1990). As amostras foram incubadas durante 3 min e filtradas (filtro 30 µm) em microtubos de 2 mL. Subsequentemente 500 µL do mesmo tampão foram adicionados para lavagem da placa e filtrados novamente. As amostras foram centrifugadas a 100 x g por 5 min. O sobrenadante foi removido e o *pellet* resuspendido e incubado em 100 µL do tampão OTTO-I por 10 min (Rossi et al. 2008; Carvalho et al. 2008; Abreu et al. 2008). As suspensões nucleares foram coradas com 1,5 mL de tampão OTTO-II suplementado com iodeto de propídeo (IP) (Otto 1990), após 20 min foram filtradas (filtro 20 µm) em tubos de leitura e mantidas no escuro até a leitura. As suspensões foram analisadas em citômetro de fluxo BD FACSVers[®] (BD[®]). Os histogramas foram analisados em escala logaritmica, plotados com ajuda do software FlowJo Tree Star Software[®].

Delineamento experimental e análises estatísticas

Indução de calos embriogênicos

Para a fase de indução de culturas embriogênicas, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cinco tratamentos (0, 10, 20, 30 ou 40 µM de 2,4-D), oito repetições cada, e a unidade experimental composta por uma placa de Petri contendo cinco folhas/repetição. Foram avaliadas as seguintes variáveis:

Frequência de indução (%): $\frac{\text{número de explantes com calos embriogênicos}}{\text{número de explantes totais}} \times 100$;

Taxa de oxidação (%): $\frac{\text{número de explantes oxidados}}{\text{número de explantes totais}} \times 100$.

Os dados foram submetidos à análise de regressão, sendo selecionadas dentro da equação de regressão, aquelas de efeito significativo, pelo teste F, a 1 e 5 % de significância.

Diferenciação e maturação dos embriões somáticos

Para a fase de diferenciação e maturação dos embriões somáticos, foi utilizado o delineamento blocos ao acaso (DBC), em esquema fatorial (3x5), sendo três tempos de permanência em meio de indução de culturas embriogênicas (30, 40 e 50 d), e cinco

tratamentos (controle – s/RC, c/ 2 μ M BA; c/ 4 μ M BA; c/ 2 μ M *m*-T e c/ 4 μ M *m*-T), totalizando 15 tratamentos, com quatro repetições, e a unidade experimental composta por uma placa de Petri contendo quatro calos embriogênicos/repetição. Foram avaliadas as seguintes variáveis: Número de embriões formados (estádios globular, torpedo, cotiledonar e embriões germinados); Massa fresca e seca total de embriões somáticos regenerados;

Frequência de maturação (%): $\frac{\text{número de explantes com embriões maduros}}{\text{número de explantes totais}} \times 100$; e

Porcentagem de biomassa fresca e seca de embriões (%): $\frac{\text{porcentagem da razão massa fresca ou seca dos embriões}}{\text{massa fresca ou seca total do explante}} \times 100$

Todas as variáveis foram submetidas à análise de variância e as médias foram comparadas utilizando-se o teste Tukey a 5 % de significância. As análises estatísticas das etapas de indução de calos embriogênicos e diferenciação e maturação dos embriões somáticos foram realizadas pelo *software* R versão 3.0.3 (R Core Team 2014), com auxílio do pacote ExpDes versão 1.1.2 (Ferreira et al. 2013) e do pacote Easynova (Arnhold 2014). Para as análises de indução embriogênica foi calculada a média de frequência de indução e da taxa de oxidação, e os valores plotados no *software* Sigma Plot® (versão 11.0).

Caracterização anatômica e histoquímica

Microscopia de luz e caracterização histoquímica

Para caracterização estrutural e histoquímica, amostras de calos embriogênicos foram coletadas a cada 10 d, durante o processo de indução (30 d), e ao final do ciclo de maturação (25 d), e fixadas em solução de Karnovsky (1965). Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série etílica (10 a 95 %), e incluídas em resina metacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha). Secções longitudinais com 5 μ m de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA). As mesmas foram coradas com azul de toluidina (pH 3,2) (O'Brien e McCully 1981) para caracterização estrutural; com Xylidine Ponceau (XP) (Vidal 1977) para detecção de proteínas totais; com ácido periódico–reagente de Schiff (PAS) (Feder e O'Brien 1968) para polissacarídeos totais; com lugol para evidenciar amido (Johansen 1940); com vermelho de rutênio para comprovar a presença de substâncias pécticas (Rawlins e Takahashi 1952); e com vermelho neutro (Kirk 1970) para detecção de lipídeos.

Nesta fase, a captura de imagens foi realizada em microscópio de luz e fluorescência (AX70TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japan) com câmera digital acoplada (modelo Olympus E-330). As secções submetidas ao vermelho neutro foram examinadas em luz UV com filtro de excitação azul (BP 450 - 490 nm).

Caracterização micromorfológica: microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Amostras fixadas em Karnovsky, foram pré-tratadas durante duas horas com solução de tetróxido de ósmio e cacodilato (relação 1:1, v/v). Em seguida, foram desidratadas em série de acetona e secas em ponto crítico com CO₂ (Bozzola e Russell 1992), utilizando equipamento Bal-tec (modelo CPD 030, Baltec, Bralzers, Alemanha). Posteriormente, foram fixadas em *stubs*, seguida da deposição metalizada com ouro, em equipamento Balzers de congelamento a seco (modelo FDU 010, BalTec, Balzers, Liechtenstein), acoplado ao conjunto de pulverização catódica (modelo SCA-010).

As observações e registros fotográficos foram realizados em microscópio eletrônico de varredura (LEO 1430 VP, Zeiss, Cambridge, Reino Unido), e todas as imagens processadas digitalmente.

Localização dos transcritos de *EgSERK* durante a embriogênese somática em *E. grandiflorum* por hibridização *in situ*

Coleta e preparo dos tecidos

Foram coletados calos embriogênicos com 0, 10, 20, 30 d de indução e embriões somáticos com 25 d no meio de maturação. Os explantes foram coletados em condições livres da ação de RNAses e imersos imediatamente em solução de paraformaldeído 4 %, pH 7,0), sendo mantidos por 16 h nessa solução a 4 °C. Em seguida, procedeu-se a desidratação das amostras em série etílica (10 a 70 %). As amostras foram armazenadas a - 20 °C até o momento de serem utilizadas, e posteriormente desidratadas em etanol 80, 90 e 100 % e infiltradas em parafina histológica (Histosec[®], Brasil).

Secções longitudinais de 4 µm foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço manual (Olympus America Inc CUT 4055) e colocadas em lâminas Fisherbrand[®] (Fisher Scientific) livres de RNAses, secas a temperatura ambiente e armazenadas a 4 °C, até o uso. Antes da hibridização, a parafina foi removida com xilol 100 % (duas trocas de 5 min),

solução contendo xilol e etanol (em uma relação 1:1, v/v) por 5 min etanol 100 % (duas trocas de 5 min).

Síntese das sondas sense e antisense marcadas com digoxigenina

Sondas de RNA senso e anti-senso foram sintetizadas utilizando como molde uma sequência parcial de 878 bp do gene *SERK* de *Eustoma grandiflorum* (*EgSERK-like*). O fragmento previamente clonado codifica uma região conservada que se estende do domínio SPP até parte do domínio kinase. As sondas foram sintetizadas por transcrição *in vitro*, utilizando o *DIG RNA Labeling kit (SP6/T7)* (Roche®) de acordo com as instruções do fabricante.

Reação de hibridização

Uma alíquota de 60 ng de tRNA de levedura (Invitrogen®) e 60 ng de sonda foram desnaturados a 80 °C por 5 min e adicionados a 100 µL do tampão de hibridização (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; NaCl 300 mM, formamida 50 %, EDTA 1 mM pH 8,0; solução de Denhardt 1X) e colocado nas lâminas, as quais foram incubadas em câmara úmida, a 42 °C, no escuro durante 16 h.

Reação de pós-hibridização e detecção imunológica

Após a hibridização, as lâminas foram lavadas em SSC 4X, 2X, 1X e 0,5X (solução SSC 20X = NaCl 3 M, Na₃-citrato 0,3 M, pH 7,2), cada solução por 20 min. Em seguida, foram mantidas por 5 min em tampão de detecção 1 (0,1 M de Tris-HCl pH 7,5; 0,15 M de NaCl) e incubadas por 30 min na solução bloqueadora 2 (tampão de detecção 1 acrescido de BSA 1 %). As secções foram novamente lavadas em tampão de detecção 1 por 5 min e incubadas durante 1 h com anticorpo Anti-Digoxigenina-AP, Fab Fragments (Roche®) diluído 1:1.000 em tampão de detecção 1. Após a sequência de duas lavagens, de 15 min cada, em tampão de detecção 1 e uma lavagem de 5 min em tampão de detecção 3 (0,1 M de Tris-HCl pH 7,5; 0,1 M de NaCl; 0,05 M de MgCl₂, com pH final ajustado para 9,5) as secções foram incubadas em solução de coloração contendo 4,5 µL de BCIP (5-bromo- 4-cloro-3-indolil-fosfato) (Promega®, USA) (0,05 g mL⁻¹) e 4,5 µL de NBT (nitrobluetetrazólio) (Promega®, USA) (0,05 g mL⁻¹) em 1 mL de tampão 3 por aproximadamente 40 min, no escuro. Para cessar a reação, as secções foram incubadas no

tampão de detecção 4 (0,01 M de Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA) por 10 min, e depois, lavadas duas vezes em água bidestilada.

A análise e captura das imagens foram realizadas em microscópio de luz e fluorescência (AX70TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japan) com câmera digital acoplada (modelo Olympus E-330). As secções submetidas ao vermelho neutro foram examinadas em luz UV com filtro de excitação azul (BP 450 - 490 nm).

RESULTADOS

Indução de embriogênese somática

Observou-se indução de calos no meio com adição de ANA e 2,4-D, porém os calos obtidos nos meios com ANA e 2,26 μM de 2,4-D não se desenvolveram. Por outro lado, o tratamento sem regulador de crescimento (s/RC), não apresentou responsividade à indução embriogênica (Tabela 1).

Tabela 1. Reações observadas após o cultivo de explantes foliares de *Eustoma grandiflorum* cultivados em meio sem regulador de crescimento (s/RC), com adição de concentrações de 2,4-D e ANA

Meio de cultivo	Concentração (μM)	Calos	Observações
s/RC	-	-	Sem reação
2,4-D	2,26*	+	Calos
	10, 20, 30 ou 40	+	Calos embriogênicos
ANA	8,06	+	Pouco calo/rizogênese
	10, 20, 30 ou 40	-	Morte

*Recomendado por Nhut et al. (2006). Símbolos: (+) presença; (-) ausência.

As concentrações de 10, 20, 30 e 40 μM de 2,4-D induziram formação de embriões somáticos. A frequência de indução ajustou-se a um modelo linear decrescente, sendo que o maior valor observado foi de 100 % nas concentrações de 10 e 20 μM de 2,4-D. Já para o meio suplementado com 30 e 40 μM de 2,4-D, a frequência de indução foi de 97,5 e 90 %, respectivamente (Fig. 1a).

A taxa de oxidação ajustou-se a um modelo quadrático crescente; a medida que aumentou a concentração do 2,4-D houve aumento na taxa de oxidação do material. No meio de cultivo suplementado com 10 ou 20 μM de 2,4-D o material não apresentou oxidação, porém em explantes foliares cultivados sob 30 ou 40 μM de 2,4-D a taxa de oxidação foi de 10 e 20 %, respectivamente (Fig. 1b).

Potencial de regeneração dos embriões somáticos

Comparou-se o potencial de regeneração de embriões somáticos entre 15 tratamentos. Para a frequência de maturação, não houve interação entre o tempo de permanência no meio de indução e os meios utilizados na maturação. Os tempos de permanência no meio de indução (30, 40 e 50 d) não apresentaram diferença significativa entre si para a variável frequência de maturação. Porém, houve diferença significativa entre

os meios utilizados na maturação, sendo que a maior frequência de maturação foi observada nos meios com 2 μ M de BA (100 %), 4 μ M de *mT* (100 %) e 2 μ M de *mT* (91,7 %), sem diferença significativa entre esses tratamentos (Tabela 2a).

Para o número de embriões, massa fresca e seca total de embriões somáticos, porcentagem de biomassas fresca e seca de embriões houve interação significativa entre o tempo de duração no meio de indução e os meios utilizados na maturação. Não houve diferença significativa para o número de embriões/explante entre o material que permaneceu 30 d na indução com o que permaneceu 40 d em meio de maturação (2 μ M de *mT*, 4 μ M de BA ou s/RC). Por outro lado, o material que permaneceu apenas 30 d em meio de indução, seguido de maturação em meio com 2 μ M de BA ou 4 μ M de *mT*, originou maior número de embriões/explante (25,9 e 18,3, respectivamente), quando comparado ao material que permaneceu 40 ou 50 d em meio de indução (Tabela 3b). Da mesma forma, quando permaneceu 30 d em meio de indução, observou-se maior número de embriões/explante nos mesmos meios relatados anteriormente, quando comparados aos meios s/RC, com 4 μ M de *mT* ou 2 μ M de BA e permaneceu 30 d na indução (Tabela 2b).

Maiores valores médios de massa fresca total de embriões somáticos e porcentagem de biomassa fresca de embriões foram obtidos nos meios com 2 μ M de BA; e 2 ou 4 μ M de *mT* no material que permaneceu 30 d no meio de indução, sem diferença significativa entre eles. No entanto, os embriões somáticos germinados em meio com 2 μ M de BA apresentaram maior valor médio para as duas avaliações em relação aos embriões que permaneceram 40 ou 50 d na indução. Porém, quando adicionado 2 ou 4 μ M de *mT* no meio de maturação não houve diferenças significativas comparado aos demais tempos de permanência em meio de indução (Tabela 2c, 2d).

O maior valor de massa seca total de embriões somáticos observado foi de 23,3 mg do material que permaneceu 30 d no meio de indução e maturado em meio acrescido de 2 μ M de BA. Contudo, este valor não apresentou diferença significativa quando comparado aos meios de maturação adicionados de 2 ou 4 de *mT*, no mesmo tempo de permanência na indução (14,2 e 12,1, respectivamente) (Tabela 2e).

A porcentagem de biomassa seca total de embriões somáticos foi estatisticamente inferior quando o material foi germinado com 4 μ M de BA ou s/RC com 30 d no meio de indução. O material que permaneceu por 30 d na indução e maturado com 2 μ M de BA

apresentou 34,2 % de biomassa seca total de embriões somáticos, constituindo o maior valor observado, porém não diferiu estatisticamente dos valores médios obtidos nos meios com adição de *mT* (Tabela 2f).

Tabela 2 Frequência de maturação (%) (a); Número de embriões (b); Massa fresca total de embriões somáticos regenerados (mg) (c); Porcentagem de biomassa fresca de embriões (%) (d); Massa seca total de embriões somáticos regenerados (mg) (e) e Porcentagem de biomassa seca de embriões (%) (f) em função dos dias de permanência em meio de indução de calos embriogênicos, do regulador de crescimento e da sua concentração utilizada, na formação de embriões somáticos em explantes foliares de *Eustoma grandiflorum*.

(a)				(b)			
Tempo de indução		Tratamentos		Tratamentos	30 d	40 d	50 d
30 d	79,9 a	s/RC	22,2 c	s/RC	2,3 Ac	2,5 Ab	0,8 Ab
40 d	78,3 a	<i>mT</i> - 2 μ M	91,7 a	<i>mT</i> - 2 μ M	14,9 Ab	17,7 Aa	3,3 Bab
50 d	66,7 a	<i>mT</i> - 4 μ M	100 a	<i>mT</i> - 4 μ M	18,3 Aab	10,2 Bab	12,5 Aba
		BA - 2 μ M	100 a	BA - 2 μ M	25,9 Aa	17,6 Ba	7,9 Cab
		BA - 4 μ M	61,1 b	BA - 4 μ M	5,25 Ac	3,4 Ab	4,9 Aab

(c)				(d)			
Tratamentos	30 d	40 d	50 d	Tratamentos	30 d	40 d	50 d
s/RC	22,5 Ab	19,3 Ac	9 Ac	s/RC	6,9 Ab	2,4 Ab	1,5 Ab
<i>mT</i> - 2 μ M	259,9 Aa	326,9 Aa	36,6 Babc	<i>mT</i> - 2 μ M	31,9 Aa	39,1 Aa	6,5 Bab
<i>mT</i> - 4 μ M	281,4 Aa	145,3 ABb	133,1 Ba	<i>mT</i> - 4 μ M	34,2 Aa	19,2 Aba	14,6 Ba
BA - 2 μ M	443,6 Aa	171,5 Bab	70,4 Aa	BA - 2 μ M	43,8 Aa	19,1 Ba	7,2 Bab
BA - 4 μ M	28,8 Ab	23,3 Ac	14,9 Abc	BA - 4 μ M	5,8 Ab	5,1 Ab	3,2 Ab

(e)				(f)			
Tratamentos	30 d	40 d	50 d	Tratamentos	30 d	40 d	50 d
s/RC	0,8 Ab	1 Ac	0,3 Ac	s/RC	2,2 Ab	1,7 Ac	0,7 Aa
<i>mT</i> - 2 μ M	14,2 Aa	18,7 Aa	1,9 Babc	<i>mT</i> - 2 μ M	24,6 Aa	31,8 Aa	4 Ba
<i>mT</i> - 4 μ M	12,1 Aa	7,8 Ab	7,4 Aa	<i>mT</i> - 4 μ M	22,2 Aa	15,1 Abc	12,6 Aa
BA - 2 μ M	23,3 Aa	10,5 Bab	3,8 Bab	BA - 2 μ M	34,2 Aa	15,8 Bb	5,8 Ba
BA - 4 μ M	1,9 Ab	1,9 Ac	0,8 Abc	BA - 4 μ M	3,9 Ab	3,7 Abc	1,9 Aa

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Citometria de fluxo

Plantas regeneradas foram analisadas por citometria de fluxo. As suspensões nucleares obtidas de protocolos adaptados de citometria de fluxo apresentaram núcleos intactos, isolados e estequiometricamente corados. Os valores de núcleos analisados foram obtidos de 10.000 eventos para todas as plantas. Todas as amostras apresentaram o mesmo nível de ploidia semelhantes com plantas de origem seminífera (padrão externo) (Fig. 2a). A citometria revelou que todas as plantas regenerantes são diploides (2x) (Fig. 2b).

Desenvolvimento dos embriões somáticos

Como explantes foram utilizadas folhas de plantas germinadas *in vitro* (Fig. 3a). A análise estrutural destes explantes, em corte longitudinal, revelou células do mesofilo intactas, assim como nervura secundária contendo sistema vascular bem definido (Fig. 3b).

Após 10 d de cultivo em meio MS com 10 μ M de 2,4-D foi observado início de calogênese nas regiões periféricas dos explantes, formando calo cicatricial (Fig. 3c). Houve desarranjo das células do mesofilo com divisões no sentido anticlinal e formação de zonas pró-embriogênicas. Além disso, foram observadas divisões anticlinais originadas de células perivasculares. No mesmo período de cultivo observaram-se dois grupos distintos de células - o primeiro com células maiores e vacuolizadas e outro grupo de células com características meristemáticas, menores, isodiamétricas, com núcleo proeminente e citoplasma denso, com características de células embriogênicas (Fig. 3d).

Aos 20 d observou-se o desenvolvimento dos calos embriogênicos (Fig. 3e), apresentando intensas divisões anticlinais, as quais originaram pró-embriões com ausência de protoderme bem definida (Fig. 3f). Aos 30 d houve aumento do tamanho dos calos embriogênicos (Fig. 3g) e rediferenciação gradual e assincrônica das zonas pró-embriogênicas, originando embriões somáticos em estágio globular, com protoderme bem delimitada e vascularização. Observou-se aumento gradual do nível de vacuolização (Fig. 3h).

Somente após a transferência do material ao meio contendo 2 μ M de BA (25 d de cultivo) houve germinação dos embriões somáticos com desenvolvimento dos primórdios foliares (Fig. 3i-k). A secção longitudinal do embrião somático germinado com 25 d no meio de maturação demonstrou a presença de epiderme, meristema fundamental, sistema vascular desenvolvido, primórdios foliares e domo apical bem evidente (Fig. 3l). Nota-se no domo apical e nos primórdios foliares do embrião somático germinado, o crescimento inicial característico da espécie em forma de roseta (Fig. 3m). Vitroplantas provenientes da ES a partir de explantes foliares de *E. grandiflorum* após 3 semanas de aclimatização (Fig. 3n).

Caracterização histoquímica

Foi acompanhada a mobilização das reservas ao longo do processo de embriogênese somática a partir de explantes foliares de *E. grandiflorum*. Houve aparente variação nas

concentrações de amido, polissacarídeos, substâncias pécicas e proteínas totais. As observações foram realizadas com o auxílio de testes histoquímicos: lugol, PAS, vermelho de rutênio e XP, respectivamente. Porém, para lipídeos, o teste de vermelho neutro foi negativo na fase de indução embriogênica.

Na fase de maturação, aos 25 d os embriões somáticos germinados apresentaram reação positiva para lugol, PAS, vermelho de rutênio e vermelho neutro. Observou-se também decréscimo gradual na quantidade de proteínas durante o processo de embriogênese somática até o completo consumo aos 25 d no meio de diferenciação e maturação (Tabela 3).

Tabela 3. Testes histoquímicos ao longo das fases de indução e maturação na embriogênese somática de *Eustoma grandiflorum* a partir de discos foliares.

Estádio de desenvolvimento		Testes histoquímicos				
		Lugol	PAS	Vermelho de rutênio	XP	Vermelho neutro
Indução	0 d	+	+	+	+	-
	10 d	+	+	+++	++	-
	20 d	++	+++	++	+++	-
	30 d	+++	+	+	+++	-
Maturação	25 d	+	+	+	-	+

Abreviações: (-) reação negativa; (+) reação positiva; presença estrutural; (++) reação positiva; acúmulo da substância; e (+++) reação positiva intensa; intenso acúmulo da substância.

O tratamento controle apresentou reação positiva para o teste de vermelho de rutênio demonstrando a natureza pécica da parede celular (Fig. 4a). Observou-se reação com PAS associado à celulose e hemicelulose da parede celular, assim como da deposição de amido nas células do mesofilo (Fig. 4b). Já o teste de XP evidenciou a presença de proteínas nas células do mesofilo e do feixe vascular (Fig. 4c).

Aos 10 d da indução foi observado aumento aparente de substâncias pécicas associadas à parede celular nas células em divisão (Fig. 4d). Assim também, com o início das divisões celulares, houve estabilidade no acúmulo de grãos de amido evidenciado pelo teste histoquímico de PAS (Fig. 4e). Houve aumento na concentração de proteínas no início das divisões celulares (Fig. 4f).

Com 20 d de cultivo houve reação positiva do teste de vermelho de rutênio (Fig. 4g). No mesmo período observou-se aumento aparentemente de amido nas zonas pró-

embriogênicas, assim como reação positiva da parede celular ao PAS (Fig. 4h). O teste com XP evidenciou a presença de proteínas nas zonas pró-embriogênicas (Fig. 4i).

Ao final do cultivo, no meio de indução com 30 d, observou-se presença de pectina da parede celular (Fig. 4j), houve aumento aparente da concentração de grãos de amido nos embriões somáticos corados com PAS (Fig. 4k) e presença de corpos proteicos nos embriões somáticos, já com presença de esclereides (Fig. 4l).

Caracterização do padrão de expressão de *SERK* por hibridização *in situ*

Cortes longitudinais da folha, no tempo zero da indução de *E. grandiflorum*, mostram detalhe do feixe vascular e células do mesofilo (Fig. 5a). A hibridização *in situ* dos cortes histológicos com sonda antisenso não sinalizou a presença de transcritos do gene *SERK* nessa data (Fig. 5b). Aos 10 d no meio de indução com 10 μ M de 2,4-D foram observadas divisões anticlinais nas células perivasculares com formação de zonas pró-embriogênicas (Fig. 5c). Nesta fase houve forte marcação da expressão de *SERK* na região proliferativa (Fig. 5d).

Aos 20 d intensificaram-se as divisões anticlinais às quais deram origem aos pró-embriões (Fig. 5e). As regiões pró-embriogênicas apresentaram sinal característico da expressão de *SERK* (Fig. 5f). Houve desenvolvimento das zonas pró-embriogênicas dando origem a embriões somáticos em estágio globular aos 30 d (Fig. 5g). Os embriões somáticos globulares mostraram forte marcação da expressão de *SERK* (Fig. 5h). Após 25 d da transferência do material embriogênico ao meio de maturação, observou-se vitroplantas com primórdios foliares e domo apical bem formado (Fig. 5i). As vitroplantas hibridizadas com sonda anti-senso não apresentaram sinal de expressão de *SERK* (Fig. 5j).

DISCUSSÃO

Indução de culturas embriogênicas

Para induzir embriogênese somática em explantes foliares de *E. grandiflorum*, inicialmente foi testado o uso de 2,26 μ M de 2,4-D, como recomendado por Nhut et al. (2006) para *E. grandiflorum* cv “Dark Purple”. Porém, a concentração utilizada não foi adequada para a cultivar “Abc 2-3 Rose”, estudada no presente trabalho. Diante disso, foi aumentada a concentração do mesmo regulador de crescimento, além de testar o uso de ANA no meio de indução, em substituição ao 2,4-D.

A indução de calos embriogênicos depende da interação entre o genótipo e as condições do cultivo *in vitro* (Visarada et al. 2002). Assim também, a combinação das alterações epigenéticas e hormonais causadas nos tecidos desempenham papel essencial na adaptação dos tecidos aos fatores de estresse, incluindo a reprogramação das vias do desenvolvimento celular, tais como: desdiferenciação celular, morte celular, proliferação celular, formação de meristemas ou embriogênese (Fehér, 2014). Entre as distintas espécies e/ou cultivares, existem grandes variações na responsividade dependendo do explante e das condições aplicadas. Assim, estudos com diversas cultivares de *E. grandiflorum* mostraram diferenças na indução de calos, no potencial de regeneração e na taxa de regeneração de plantas no cultivo de anteras, demonstrando que as respostas do cultivo *in vitro* nessa espécie são genótipo-específicas (Zhou et al. 2014). Da mesma forma, no cultivo *in vitro* de *Passiflora* spp. com uso de 4,5 μ M BA e 13,6; 18,1; 22,6 ou 27,1 μ M de 2,4D, observou-se que três das quatro espécies estudadas geraram embriões somáticos para todos os tratamentos, porém uma das espécies induziu-se apenas organogênese adventícia, sugerindo que os sinais morfogenéticos entre as espécies de *Passiflora* são também limitados pela genética (Rosa et al. 2014).

Por outro lado, a concentração e a escolha dos reguladores de crescimento, são fatores determinantes para o estabelecimento de um protocolo de embriogênese somática nas espécies (Elmeer 2013). Em *Gentiana* spp. o acréscimo de ANA ao meio de cultivo foi mais eficiente que o uso de 2,4-D na indução embriogênica a partir de segmentos foliares (Fiuk e Rybczyński 2008). Contrário ao observado no presente trabalho, em que somente os meios com 2,4-D induziram calos embriogênicos em *E. grandiflorum*. Quando se utilizou ANA no meio de cultura houve formação de calos, os quais geraram raízes, como também foram observadas necrose e danos irreversíveis nos tecidos, ocasionando morte celular. Semelhantemente ao observado por Rezaee et al. (2012), que relataram que o uso de 16,11 μ M de ANA combinado com 17,13 μ M de ácido indolil-3-acético (AIA) no meio de cultura induziu calogênese em discos foliares, segmentos internodais, explantes radiculares, anteras e pétalas de *lisianthus*, porém os calos induzidos não apresentaram natureza embriogênica.

Estudos mostram que a indução de calos embriogênicos em *Chrysanthemum* foi alcançada por meio da mistura de 2,4-D e BA, na ordem de 4,52 e 13,32 μ M cada (Naing et

al. 2013). Em outras espécies, o 2,4-D foi utilizado sozinho, na ordem de 2-8 μM para *Lysionotus pauciflorus* (Godo et al. 2010); 2,5-9 μM para *Chrysanthemum* (Mani e Senthil 2011) e 13-18,1 μM para *Rosa hybrida* (Bao et al. 2012). Para *Campanula punctata*, o aumento da concentração de 2,4-D proporcionou redução gradual na frequência de indução embriogênica (Sivanesan et al. 2011), assim como redução da frequência embriogênica e crescimento lento de calos embriogênicos em *Salicornia brachiata* (Rathore et al. 2014). Em explantes foliares de *E. grandiflorum* o aumento da concentração do 2,4-D no meio de cultura levou a uma ligeira redução na frequência de indução, assim como aumento da taxa de oxidação. Diante disso, recomenda-se o uso de 10 μM de 2,4-D para induzir calos embriogênicos nesta espécie.

Outro fator importante a ser considerado quando do estabelecimento de protocolos de indução embriogênica é o período de exposição ao regulador de crescimento (Elmeer 2013). Choudhary et al. (2009) observaram que o tempo de duração no meio de indução com 2,4-D é inversamente proporcional à capacidade de regeneração de calos embriogênicos em *Vigna aconitifolia*, como também, relatado para *Oryza sativa* (Gairi e Rashid 2004) e *Brassica napus* L. (Ardebili e Shariatpanahi 2011). No presente trabalho, embora a frequência de maturação não tenha sido afetada pelo tempo de duração no meio com 2,4-D, o número de embriões maturados, a massa fresca e seca total de embriões somáticos, assim como a porcentagem de biomassa fresca e seca de embriões foram prejudicadas com o aumento do tempo de indução, sugerindo a permanência do material por um período máximo de 30 d.

Maturação dos embriões somáticos

Juntamente com a demanda por auxinas, ressalta-se igualmente a importância da presença de citocininas em combinação ou seguidas das auxinas (Zimmermann 2010). Como exemplo, o uso de 4,44 μM de BA promoveu diferenciação e maturação de embriões somáticos de *E. grandiflorum* após a indução com 2,4-D a partir de explantes foliares (Nhut et al. 2006). No entanto, como alternativas para aprimorar os protocolos de embriogênese somática a partir de discos foliares em algumas espécies outras substâncias foram sugeridas, como o uso de cinetina (KIN), Thidiazuron (TDZ) ou Zeatina (ZEA) (Mikula e Rybczyński 2001; Fiuk e Rybczyński 2008; Shibli et al. 2012; Haque e Ghosh 2014). Contudo, o uso de topolinas ainda não havia sido proposto para protocolos de

embriogênese somática, embora, as topolinas especialmente *mT* e seus derivados sejam empregadas para otimizar protocolos de propagação *in vitro* nas espécies (Werbrouck et al. 1996; Valero-Aracama et al. 2009; Ojtania 2010; Lai et al. 2013; Amoo et al. 2013; Gentile et al. 2014), além de reduzir certas desordens fisiológicas causadas pelo uso de citocininas no cultivo *in vitro* (Aremu et al. 2011).

Estudos mostram que a escolha da concentração da citocinina utilizada pode ser outro fator determinante para o sucesso ou fracasso de qualquer protocolo *in vitro* (Amoo et al. 2010; Werbrouck 2010). No presente trabalho, foi confirmado que o BA, na concentração de 4 μM , permitiu germinação de embriões somáticos. Porém, foi o meio menos eficiente entre os tratamentos utilizados, além de desenvolver meristemoides nas vitroplantas geradas (dados não mostrados). A presença de meristemoides na diferenciação de embriões somáticos também foi descrita por Yang et al. (2011b), quando utilizaram 5 μM de BA no meio para diferenciação e maturação de embriões somáticos pré-induzidos com TDZ a partir de explantes foliares de *Primulina tabacum*. Esses autores observaram diferenciação de embriões somáticos, porém, também houve indução de organogênese adventícia originada a partir dos embriões somáticos. Por outro lado, concentrações abaixo de 1,33 μM de BA comprometeram a performance da ES a partir de discos foliares de *Curcuma amada*, com a redução do número de embriões somáticos germinados (Soundar Raju et al. 2012).

No presente trabalho a adição de 2 μM de BA, assim como de 2 ou 4 μM de *mT* promoveram diferenciação e maturação de calos embriogênicos em *E. grandiflorum*. Contudo, o uso de 2 μM de BA gerou maior número de embriões/explante, os quais apresentaram alto vigor, evidenciado pelo peso da massa fresca e seca de embriões somáticos, assim como pela porcentagem de biomassa fresca e seca produzida.

Com base nos estudos realizados recomenda-se o uso de 2 μM de BA no meio de diferenciação e maturação de calos embriogênicos pré-induzidos com 10 μM de 2,4-D em explantes foliares de *E. grandiflorum*. Entretanto, o uso de *mT* pode ser uma alternativa adequada nesta fase, já que os valores médios das avaliações obtidos também foram promissores. Diante disto, sugerem-se mais estudos e acompanhamento do desenvolvimento das plantas oriundas de cada meio de maturação.

Citometria de fluxo

As modificações genéticas que podem ocorrer durante o cultivo *in vitro* tornam a variação somaclonal desvantajosa em processos clonais quando a ocorrência de variação espontânea descontrolada e aleatória é um fenômeno inesperado e, principalmente, indesejado (Larkin 1998; Sahijram et al. 2003). Assim também, a estabilidade genética durante a propagação clonal de linhagens elites ou transgênicas torna-se um pré-requisito para o sucesso da técnica (Shen et al. 2007; Fiuk et al. 2010).

O uso prolongado de 2,4-D é responsável por variações genéticas e epigenéticas das culturas (Gesteira et al. 2002; Rakoczy-Trojanowska 2002; Von Arnold 2008). Assim, variação do nível de ploidia foi observada com o uso deste regulador de crescimento nas espécies (Leal et al. 2006; Paim-Pinto L. et al. 2010; Fraga et al. 2012; Acanda et al. 2013; Silva e Carvalho 2013). Contudo, as análises de citometria do material regenerado da embriogênese somática de explantes foliares de *E. grandiflorum* com o uso de 10 μ M de 2,4-D e 2 μ M de BA, confirmaram a estabilidade de ploidia das plântulas, embora houvesse ocorrido algumas anormalidades no fenótipo de embriões somáticos, como hiperhidricidade e fusão de cotilédones. Da mesma forma, a uniformidade no nível de ploidia foi relatada para outras espécies regeneradas via embriogênese somática induzida com o uso de 2,4-D (Loureiro et al. 2005; Cui et al. 2008; Zhao et al. 2012; Naing et al. 2013; Stanišić et al. 2015).

A citometria de fluxo foi utilizada para avaliar o nível de ploidia de plantas de cinco espécies de *Gentiana*, regeneradas por embriogênese somática a partir de discos foliares, as quais apresentaram o mesmo nível de ploidia das plantas matrizes estabelecidas mediante germinação de sementes (Fiuk e Rybczyński 2008). Assim, a citometria de fluxo tem sido utilizada para detectar variantes somaclonais em relação ao nível de ploidia, cujos resultados encontrados variam de acordo com o genótipo, explante e o sistema utilizado para induzir embriogênese.

Alterações morfológicas durante a embriogênese somática

Os estudos anatômicos realizados no presente trabalho revelam a origem celular, o desenvolvimento e mudanças citológicas ao longo do tempo de embriões somáticos a partir de explantes foliares de *E. grandiflorum*. As alterações celulares ocorreram através do uso de reguladores de crescimento no meio de indução embriogênica, inicialmente observam-se

mudanças da polaridade celular, além de promover divisões assimétricas nas células dos tecidos, sendo um pré-requisito para o início do processo embriogênico (Ammirato 1983; Fehér et al. 2003). A origem de calos embriogênicos em *E. grandiflorum* está associada às intensas divisões anticlinais que as células perivasculares e do mesofilo sofreram, devido a menor diferenciação dessas células (Dubois et al. 1991; Tarré et al. 2004; Rocha et al. 2014).

O desenvolvimento dos embriões somáticos a partir de explantes foliares de *E. grandiflorum* foi de origem indireta. Os calos caracterizam-se por apresentar células em diferentes estádios de diferenciação e, conseqüentemente, com diferentes graus de determinação (Guerra et al. 1998), o que explica a assincronicidade do padrão de indução, diferenciação e maturação dos embriões somáticos em *E. grandiflorum*.

As alterações na morfogênese dos calos foram expressas com a formação de células embriogênicas. As células constituintes do calo embriogênico apresentaram dimorfismo, células menores e com características meristemáticas, além de células maiores e vacuolizadas. Estas características também foram observadas durante a embriogênese somática em discos foliares de *Dactylis glomerata* L., evidenciando células pequenas, isodiamétricas com citoplasma denso, as quais demonstraram competência embriogênica; além da menor quantidade de células vacuolizadas alongadas e células não embriogênicas ao longo do processo (Somleva et al. 2000). Características morfológicas semelhantes foram observadas durante a embriogênese somática de *Gentiana kurroo* (Fiuk e Rybczyński 2007), *Passiflora cincinnata* (Silva et al. 2009), *Passiflora edulis* (Paim-Pinto et al. 2011), *Oryza sativa*, *Phaseolus vulgaris*, entre outros.

No presente trabalho a desdiferenciação das zonas pró-embriogênicas originaram embriões somáticos em estágio globular com protoderme bem definida. A formação da protoderme é um dos primeiros eventos durante a embriogênese zigótica em *Arabidopsis thaliana* (De Smet et al. 2010). O mesmo padrão de desenvolvimento é observado durante o processo de embriogênese somática em plantas (Rocha et al. 2012; Silva et al. 2013; Delporte et al. 2014). O desenvolvimento da protoderme nos embriões somáticos de *E. grandiflorum* pode ser utilizado como marcador para o estabelecimento do período mais adequado de permanência no meio de indução, uma vez que o completo desenvolvimento

da protoderme coincidiu com melhor tempo de permanência (30 d) no meio de indução com 10 μ M de 2,4-D, como estudado na fase de maturação dos embriões somáticos.

Após a transferência dos embriões somáticos de *E. grandiflorum* para o meio de diferenciação e maturação com 2 μ M de BA, observou-se germinação assincrônica e regeneração de vitroplantas, apresentando similaridade morfológica com as observadas provenientes dos embriões zigóticos. Ambos exibem polaridade apical-basal e radial, meristema apical e radicular (Smertenko e Bozhkov 2014), com posterior desenvolvimento de radícula, hipocótilo e cotilédones, por meio de uma série de estádios embrionários característicos, porém, sem fusão de gametas (Jiménez 2001; Jiménez 2005).

Análises histoquímicas e mobilização de reservas

Inicialmente nas células dos explantes foliares de *E. grandiflorum* foi observado compostos de reserva, os quais cumprem função estrutural nos tecidos. Porém, ao longo do processo de embriogênese somática houve variação aparente nas concentrações de amido, polissacarídeos, substâncias pécticas e proteínas totais.

Os compostos de reserva possuem um papel importante na morfogênese *in vitro*. O aumento da concentração de amido no desenvolvimento *in vitro* e o consumo desses compostos na fase final da morfogênese tem sido correlacionado com organogênese (Mangat et al. 1990) e embriogênese somática (Cangahuala-Inocente et al. 2004). Estas observações corroboram aos resultados no presente trabalho, uma vez que houve aumento aparente do acúmulo de grãos de amido nas células do mesofilo ao longo da indução de embriogênese somática de explantes foliares de *E. grandiflorum*, os quais foram consumidos durante a fase de diferenciação e maturação dos embriões somáticos. O amido é considerado fonte primária de energia para a proliferação celular e crescimento, e o consumo desse fornece energia para o desenvolvimento de embriões somáticos, sugerindo uma regulação ativa do acúmulo de amido durante a embriogênese somática (Martin et al. 2000; Cangahuala-Inocente et al. 2004; Rocha et al. 2012).

Em *Gentiana* spp., espécie da mesma família de *E. grandiflorum*, ocorre acúmulo de amido e espessamento da parede celular das células que se encontram em constante divisão durante a embriogênese somática (Mikula et al. 2002; Mikula et al. 2004; Mikula et al. 2005). Comportamento semelhante foi observado no presente trabalho, sendo evidenciado pelos testes histoquímicos de vermelho de rutênio e PAS, os quais marcam

substâncias pécicas e polissacarídeos estruturais, respectivamente, sendo constituintes da parede celular. A embriogênese somática está acompanhada de modificações estruturais e bioquímicas da parede celular, consideradas necessárias para manutenção da arquitetura intracelular e da determinação do plano de divisão celular, assim como controlar eventos morfogênicos intracelulares (Malinowski e Filipecki 2002; Smertenko e Bozhkov 2014).

Por outro lado, as proteínas sofreram mudanças ao longo da indução de embriogênese somática de explantes foliares de *E. grandiflorum*, visto que aumentaram durante o processo embriogênico e depois foram consumidas. Comportamento semelhante observou-se na indução embriogênica de *Crocus sativus* (Karamian e Ebrahimzadeh 2010; Sharifi et al. 2012), *Cyclamen persicum* (Rode et al. 2012), *Vanilla planifolia* (Tan et al. 2013), entre outros. A detecção de níveis mais elevados de proteínas está correlacionada com ativação do metabolismo no desenvolvimento da embriogênese somática (Sallandrouze et al. 1999). Durante a germinação, as proteínas de reserva dos corpos proteicos são hidrolisadas a aminoácidos e exportadas para o citosol para serem utilizadas na síntese proteica (Taiz e Zeiger 2004).

Ao longo da embriogênese somática de *E. grandiflorum* não foi observado deposição de lipídeos. O contrário foi descrito para *Gentiana punctuata* (Mikula et al. 2004), *Medicago truncatula* (Iantcheva et al. 2005), *Picea abies* (Grigová et al. 2007), no qual observaram acúmulo e mobilização de corpos lipídicos ao longo do desenvolvimento dos embriões somáticos.

Expressão de genes *SERK* durante a embriogênese somática

Ao longo do desenvolvimento da embriogênese somática a partir de explantes foliares de *E. grandiflorum* observou-se a presença de transcritos de *SERK*. No entanto, não foi possível distinguir os distintos membros da família *SERK*, já que para a hibridização *in situ* foi utilizada uma sonda sintetizada numa região conservada de um fragmento *EgSERK-like*.

No presente trabalho, o sinal de expressão de *SERK* após a hibridização *in situ* somente foi observado com início das divisões celulares e estendeu-se ao longo do desenvolvimento embriogênico. Bem como, a expressão de *SERK* nas células com competência embriogênica foi relatado na embriogênese somática de *Daucus carota* (Schmidt et al. 1997), *Dactylis glomerata* (Somleva et al. 2000), *Cocos nucifera* (Pérez-

Núñez et al. 2009), *Medicago truncatula* (Nolan et al. 2009), *Cyclamen persicum* (Savona et al. 2012), *Araucaria angustifolia* (Steiner et al. 2012) e *Ananas comosus* (Ma et al. 2012; Ma et al. 2014).

A aquisição de competência embriogênica pelas células somáticas na embriogênese a partir de segmentos foliares de *E. grandiflorum* provavelmente foi sinalizada pela presença de 2,4-D no meio indutor. Zhang et al. (2011) estudaram a expressão dos genes *SERK* ao longo da embriogênese somática de milho com o uso de 2,4-D no meio de cultivo. Inicialmente, os autores observaram aumento da transcrição dos genes *ZmSERKs*, sugerindo que o 2,4-D poderia estar regulando a expressão de *ZmSERKs*. Contudo, na fase de maturação a adição de BA no meio de cultivo inibiu a embriogênese somática levando a diminuição da expressão de *ZmSERK1* e *ZmSERK2*. Assim, também foi observado o papel fundamental que o uso de 2,4-D no meio indutor desempenha na regulação da expressão de *SERK* e na dediferenciação celular na embriogênese somática de outras espécies (Schmidt et al. 1997; Sharma et al. 2008; Zakizadeh et al. 2010; Yang et al. 2011a; Ma et al. 2014; Silva et al. 2014). No presente trabalho, a expressão de *EgSERK*-like foi observada durante toda a fase de indução embriogênica até o estágio globular dos embriões somáticos. Porém, na fase de maturação no estágio cotiledonar dos embriões somáticos o sinal foi silenciado. Diante desses resultados, sugere-se que a expressão de *EgSERK*-like possua uma estreita ligação apenas com a fase de indução embriogênica em *E. grandiflorum*, podendo ser utilizada para monitorar a transição de células competentes para células e tecidos embriogênicos nesta espécie.

Ao longo do tempo têm sido observados diferentes padrões de expressão de *SERK* entre as espécies durante a embriogênese somática. Como por exemplo, em *Helianthus annuus* o sinal de expressão de *HaSERK* diminuiu ao longo do desenvolvimento embriogênico e organogênico. Contudo, o sinal persistiu nas células meristemáticas das estruturas geradas (Thomas et al. 2004), o que também aconteceu na embriogênese somática de *Dactylis glomerata*, *Theobroma cacao* e *Cocos nucifera* (Somleva et al. 2000; Santos et al. 2005; Pérez-Núñez et al. 2009) sugerindo a atuação dos genes *SERKs* durante os estádios mais tardios da embriogênese somática. Por outro lado, a expressão do gene *SERK* na embriogênese somática de segmentos radiculares de *E. grandiflorum*, como descrito no primeiro capítulo deste trabalho, limita-se às regiões proliferativas e se estende

somente até o desenvolvimento das zonas pró-embriogênicas, uma vez que, no estágio globular o sinal de expressão cessou. Os estudos realizados até o momento da expressão de *EgSERK*-like na embriogênese somática a partir de explantes foliares de *E. grandiflorum*, aprimoram nosso entendimento do papel que cumpre o família multigênica *SERK* nesta espécie. Diante disto, sugere-se o uso da expressão de *EgSERK*-like como uma ferramenta para monitorar a embriogênese somática durante o cultivo *in vitro* de lisianthus.

No presente trabalho foi desenvolvido um protocolo eficiente para embriogênese somática de *E. grandiflorum* a partir de explantes foliares. Demonstra-se que a combinação de auxina e citocininas, utilizadas no presente trabalho, e o tempo de permanência durante a indução de embriogênese somática, mantiveram os níveis de ploidia da espécie. Além disso, o acompanhamento das mudanças estruturais e histoquímicas do processo de indução, diferenciação e maturação dos embriões somáticos em vitroplantas, bem como a caracterização da expressão dos genes *SERK* ao longo do processo, forneceram informações inéditas e importantes para a espécie, as quais facilitarão a propagação *in vitro* em larga escala e a transformação genética de *E. grandiflorum*, a partir desse protocolo desenvolvido.

REFERÊNCIAS

- Abreu IS, Carvalho CR, Clarindo WR (2008) Chromosomal DNA content of sweet pepper determined by association of cytogenetic and cytometric tools. *Plant Cell Rep* 27:1227–33. doi: 10.1007/s00299-008-0539-4
- Acanda Y, Prado MJ, González MV, Rey M (2013) Somatic embryogenesis from stamen filaments in grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Mencía): changes in ploidy level and nuclear DNA content. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 49:276–284. doi: 10.1007/s11627-013-9499-7
- Albrecht, C, Russinova, E, Kemmerling, B, Kwaaitaal, M, Vries, SC (2008) Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE proteins serve brassinosteroid-dependent and -independent signaling sathways. *Plant Physiol* 148:611–619. doi: 10.1104/pp.108.123216
- Ammirato P V (1983) Handbook of plant cell culture, vol 1. In: Evans DA, Sharp WR, Ammirato P V., Yamada Y (Orgs.), Handbook of plant cell culture, vol 1. Macmillan, New York, p. 82–123. doi:10.1002/dvg.1020050105
- Amoo, SO, Aremu, AO, Moyo, M, Szüčová, L, Doležal, K, Van Staden, J (2013) Physiological effects of a novel aromatic cytokinin analogue in micropropagated *Aloe arborescens* and *Harpagophytum procumbens*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 116:17–26. doi: 10.1007/s11240-013-0377-0
- Amoo SO, Finnie JF, Van Staden J (2010) The role of meta-topolins in alleviating micropropagation problems. *Plant Growth Regul* 63:197–206. doi: 10.1007/s10725-010-9504-7
- Ardebili S, Shariatpanahi M (2011) Effect of 2,4-D as a novel inducer of embryogenesis in microspores of *Brassica napus* L. *Czech J Genet Plant Breed* 2011:114–122.
- Aremu, AO, Bairu, MW, Doležal, K, Finnie, JF, Van Staden, J (2011) Topolins: A panacea to plant tissue culture challenges? *Plant Cell Tiss Organ Cult* 108:1–16. doi: 10.1007/s11240-011-0007-7
- Arnhold E (2014) Easyanova: Analysis of variance and other important complementary analyzes. R package version 4.0.
- Bairu MW, Aremu AO, Van Staden J (2010) Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regul* 63:147–173. doi: 10.1007/s10725-010-9554-x
- Bao Y, Liu G, Shi X, Xing W, Ning G, Liu J, Bao M (2012) Primary and repetitive secondary somatic embryogenesis in *Rosa hybrida* “Samantha”. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 109:411–418. doi: 10.1007/s11240-011-0105-6

- Barrueto Cid LP, Teixeira J (2006) Indução de organogênese em *lisianthus*, *Eustoma grandiflorum*, a partir de fragmentos foliares cultivados *in vitro*. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF
- Bozzola JJ, Russell LD (1992) Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists. Jones and Barlett, Boston
- Branca C, Torelli A, Fermi P, Altamura M, Bassi M (1994) Early phases in *in vitro* culture of tomato cotyledons: starch accumulation and protein pattern in relation to the hormonal treatment. Protoplasma 182:59–64. doi: 10.1007/BF01403689
- Brisibe EA, Nishioka D, Miyake H, Taniguchi T, Maeda E, (1993) Developmental electron microscopy and histochemistry of somatic embryo differentiation in sugarcane. Plant Sci 89:85–92. doi: 10.1016/0168-9452(93)90173-W
- Cangahuala-Inocente GC, Steiner N, Maldonado SB, Guerra MP (2009) Patterns of protein and carbohydrate accumulation during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana*. Pesq Agropec Bras 44:217–224. doi: 10.1590/S0100-204X2009000300001
- Cangahuala-Inocente GC, Steiner N, Santos M, Guerra MP (2004) Morphological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. Protoplasma 224:33–44. doi: 10.1007/s00709-004-0055-5
- Carvalho, CR, Clarindo, WR, Praça MM, Araújo FS, Carels N, (2008) Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L., an important biofuel plant. Plant Sci 174:613–617. doi: 10.1016/j.plantsci.2008.03.010
- Choudhary K, Singh M, Rathore MS, Shekhawat NS (2009) Somatic embryogenesis and *in vitro* plant regeneration in moth bean [*Vigna aconitifolia* (Jacq.) Marechal]: a recalcitrant grain legume. Plant Biotechnol Rep 3:205–211. doi: 10.1007/s11816-009-0093-8
- Cui J, Chen J, Henny RJ (2008) Regeneration of *Aeschynanthus radicans* via direct somatic embryogenesis and analysis of regenerants with flow cytometry. In Vitro Cell Dev Biol Plant 45:34–43. doi: 10.1007/s11627-008-9147-9
- De Smet I, Lau S, Mayer U, Jürgens G (2010) Embryogenesis - the humble beginnings of plant life. Plant J 61:959–70. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04143.x
- Delporte F, Pretova A, du Jardin P, Watillon B (2014) Morpho-histology and genotype dependence of *in vitro* morphogenesis in mature embryo cultures of wheat. Protoplasma 251:1455–70. doi: 10.1007/s00709-014-0647-7
- Dole JM, Wilkins HF (2005) *Eustoma*, in: Floriculture: Principles and Species. Pearson Prentice Hall, New Jersey, p. 514–521.

- Dolezel J, Bartos J (2005) Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Ann Bot* 95:99–110. doi: 10.1093/aob/mci005
- Dubois T, Guedira M, Dubois J, Vasseur J (1991) Direct somatic embryogenesis in leaves of *Cichorium*. *Protoplasma* 162:120–127. doi: 10.1007/BF02562555
- Elmeer SE (2013) Factors Regulating Somatic Embriogênese in Plants, in: Somatic Embriogenesis and Gene Expression. In: Aslam J, Srivastava PS, Sharma MP (orgs) *Somat. Embriogenes. gene Expr.* Narosa, India, p. 56–81.
- Feder N, O'Brien T (1968) Plant microtechnique: some principles and new methods. *Am J Bot* 55:123–142.
- Fehér A (2005) Why somatic plant cells start to form embryos? *Plant Cell Monogr* 2:85–101. doi: 10.1007/7089_019
- Fehér A, Pasternak TP, Dudits D (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 74:201–228. doi: 10.1023/A:1024033216561
- Fehér A, 2014. Somatic embryogenesis - Stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1–18. doi:10.1016/j.bbagr.2014.07.005
- Ferreira EB, Cavalcanti PP, Nogueira DA (2013) ExpDes: Experimental Desings package versão 1.1.2.
- Fiuk A, Bednarek PT, Rybczyński JJ (2010) Flow Cytometry, HPLC-RP, and metaAFLP Analyses to Assess Genetic Variability in Somatic Embryo-Derived Plantlets of *Gentiana pannonica* Scop. *Plant Mol Biol Rep* 28:413–420. doi: 10.1007/s11105-009-0167-3
- Fiuk A, Rybczyński JJ (2008) Genotype and plant growth regulator-dependent response of somatic embryogenesis from *Gentiana* spp. leaf explants. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 44:90–99. doi: 10.1007/s11627-008-9124-3
- Fiuk A, Rybczyński JJ (2007) Morphogenic capability of *Gentiana kurroo* Royle seedling and leaf explants. *Acta Physiol Plant* 30:157–166. doi: 10.1007/s11738-007-0104-8
- Fraga HPF, Vieira LN, Caprestano CA, Steinmacher DA, Micke GA, Spudeit DA, Pescador R, Guerra MP (2012) 5-Azacytidine combined with 2,4-D improves somatic embryogenesis of *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret by means of changes in global DNA methylation levels. *Plant Cell Rep* 31:2165–76. doi: 10.1007/s00299-012-1327-8

- Fujimura T, Komamine A (1980) Mode of action of 2,4-D and zeatin on somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Z. Pflanzenphysiologie* 99:1–8. doi: 10.1016/S0044-328X(80)80106-1
- Gairi A, Rashid A (2004) TDZ-induced somatic embryogenesis in non-responsive caryopses of rice using a short treatment with 2,4-D. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 76:29–33. doi: 10.1023/A:1025864605846
- Gaj MD (2004) Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regul* 43:27–47. doi: 10.1023/B:GROW.0000038275.29262.fb
- Galbraith DW, Harkins KR, Maddox JM, Ayres NM, Sharma DP, Firoozabady E (1983) Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* 220:1049–51. doi: 10.1126/science.220.4601.1049
- Gentile A, Jàquez Gutiérrez M, Martínez J, Frattarelli A, Nota P, Caboni E (2014) Effect of *meta*-Topolin on micropropagation and adventitious shoot regeneration in *Prunus* rootstocks. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 118:373–381. doi: 10.1007/s11240-014-0489-1
- Gesteira AS, Otoni WC, Barros EG, Moreira MA (2002) RAPD-based detection of genomic instability in soybean plants derived from somatic embryogenesis. *Plant Breed* 121:269–271. doi: 10.1046/j.1439-0523.2002.00708.x
- Godo T, Lu Y, Mii M (2010) Micropropagation of *Lysionotus pauciflorus* Maxim. (Gesneriaceae), in: Jain, S.M., Ochatt, S.J. (Orgs.), *Protocols for In Vitro Propagation of Ornamental Plants, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, p. 127–140. doi:10.1007/978-1-60327-114-1
- Grigová M, Kubes M, Drázná N, Rezanka T, Lipavská H (2007) Storage lipid dynamics in somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*): histochemical and quantitative analyses. *Tree Physiol* 27:1533–40. doi: 10.1093/treephys/27.11.1533
- Guerra MP, Torres AC, Teixeira JB (1998) Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas, in: Torres, A.C., Caldas, L.S., Buso, J.A. (Orgs.), *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Embrapa-CBAB, Brasília, DF, p. 533–568.
- Haque SM, Ghosh B (2014) Somatic embryogenesis and synthetic seed production - a biotechnological approach for true-to-type propagation and *in vitro* conservation of an ornamental bulbaceous plant *Drimiopsis kirkii* Baker. *Appl Biochem Biotechnol* 172:4013–24. doi: 10.1007/s12010-014-0817-2
- Harbaugh BK (2007) *Lisianthus Eustoma grandiflorum*, in: Anderson, N.O. (Org.), *Flower breeding and genetics issues, challenges and opportunities for the 21st century*. Springer, Netherlands, p. 644–663. doi:10.1007/978-1-4020-4428-1_24.

- Harbaugh BK, Scott JW (2003) “Maurine Twilight” and “Maurine Daylight” – heat-tolerant lisianthus with bi-colored flowers. *HortScience* 31:131–132.
- Hecht V, Vielle-Calzada JP, Hartog MV, Schmidt EDL, Boutilier K, Grossniklaus U, Vries SC (2001) The Arabidopsis *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1* gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiol* 127:803–816. doi: 10.1104/pp.010324.In
- Iantcheva A, Slavov S, Prinsen E, Vlahova M, van Iantcheva H, Onckelen HV, Atanassov A (2005) Embryo induction and regeneration from root explants of *Medicago truncatula* after osmotic pre-treatment. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 81:37–43. doi: 10.1007/s11240-004-2774-x
- Jain S (2001) Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* 118:153–166. doi: 10.1023/A:1004124519479
- Jiménez VM (2001) Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. *Rev Bras Fisiol Veg* 13:196–223. doi: 10.1590/S0103-31312001000200008
- Jiménez VM (2005) Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regul* 47:91–110. doi: 10.1007/s10725-005-3478-x
- Johansen DA (1940) *Plant Microtechnique*, 1^o ed. McGraw-Hill Book Company, Inc, New York and London.
- Ju HJ, Jeyakumar J, Kamaraj M, Praveen N, Chung IM, Kim SH, Thiruvengadam M (2014) High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from hypocotyl and leaf explants of gherkin (*Cucumis anguria* L.). *Sci Hortic* 169:161–168. doi: 10.1016/j.scienta.2014.02.023
- Karami O, Aghavaishi B, Mahmoudi A (2009) Molecular aspects of somatic-to-embryogenic transition in plants. *J Chem Biol* 2:177–90. doi: 10.1007/s12154-009-0028-4
- Karamian R, Ebrahimzadeh H (2010) Study on changes in protein patterns and phenolic contents during somatic embryogenesis in *Crocus sativus* L. *Acta Hort* 850:117–120.
- Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27:137–138.
- Kaviani B (2014) Micropropagation of ten weeks (*Matthiola incana*) and lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) (two ornamental plants) by using kinetin (kin), naphthalene acetic acid (NAA) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Acta Sci Pol Cultus* 13:141–154.

- Kirk PJ (1970) Neutral red as a lipid fluorochrome. *Stain Technol* 45:1–4. doi: 10.3109/10520297009063373
- Lai S, Menon A, Turner S, Kodym, A, Bunn, E (2013) Development of an *in vitro* protocol for a difficult-to-propagate endemic Australian dryland sedge species *Mesomelaena pseudostygia* (Cyperaceae). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 50:99–109. doi: 10.1007/s11627-013-9542-8
- Larkin PJ (1998) Somaclonal Variation: mechanism and application in crop improvement, in: Jain, S., Brar, D.S., Ahloowalia, B.S. (Orgs.), *Induced Mutations in Crop Improvement*. p. 3–14. doi:10.1007/978-94-015-9125-6 ISBN
- Leal F, Loureiro J, Rodriguez E, Pais, MS, Santos C, Pinto-Carnide O (2006) Nuclear DNA content of *Vitis vinifera* cultivars and ploidy level analyses of somatic embryo-derived plants obtained from anther culture. *Plant Cell Rep* 25:978–85. doi: 10.1007/s00299-006-0162-1
- Li J (2010) Multi-tasking of somatic embryogenesis receptor-like protein kinases. *Curr Opin Plant Biol* 13:509–514. doi: 10.1016/j.pbi.2010.09.004
- Loureiro J, Pinto G, Lopes T, Dolezel J, Santos C (2005) Assessment of ploidy stability of the somatic embryogenesis process in *Quercus suber* L. using flow cytometry. *Planta* 221:815–22. doi: 10.1007/s00425-005-1492-x
- Ma J, He Y, Hu Z, Xu W, Xia J, Guo C, Lin S, Chen C, Wu C, Zhang J (2014) Characterization of the third SERK gene in pineapple (*Ananas comosus*) and analysis of its expression and autophosphorylation activity *in vitro*. *Genet Mol Biol* 37:530–539. doi: 10.1590/S1415-47572014000400009
- Ma J, He Y, Wu C, Liu H, Hu Z, Sun G (2012) Cloning and molecular characterization of a SERK gene transcriptionally induced during somatic embryogenesis in *Ananas comosus* cv. Shenwan. *Plant Mol Biol Report* 30:195–203. doi: 10.1007/s11105-011-0330-5
- Malinowski R, Filipecki M (2002) The role of cell wall in plant embryogenesis. *Cell Mol Biol Lett* 7:1137–1151.
- Mangat BS, Pelekis MK, Cassells AC (1990) Changes in the starch content during organogenesis *in vitro* cultured *Begonia rex* stem explants. *Physiol Plant* 79:267–274. doi: 10.1111/j.1399-3054.1990.tb06741.x
- Mani T, Senthil K (2011) Multiplication of *Chrysanthemum* through Somatic Embryogenesis. *Asian J. Pharma Tech.* 1, 13–16.
- Martin AB, Cuadrado Y, Guerra H, Gallego P, Hita O, Martin L, Dorado A, Villalobos N (2000) Differences in the contents of total sugars, reducing sugars, starch and sucrose

- in embryogenic and non-embryogenic calli from *Medicago arborea* L. Plant Sci 154:143–151. doi: 10.1016/S0168-9452(99)00251-4
- Mikuła A, Rybczyński JJ (2001) Somatic embryogenesis of *Gentiana* genus I. The effect of the preculture treatment and primary explant origin on somatic embryogenesis of *Gentiana cruciata* (L.), *G. pannonica* (Scop.), and *G. tibetica* (King). Acta Physiol Plant 23:15–25. doi: 10.1007/s11738-001-0017-x
- Mikula A, Tykarska T, Kuraś M, Rybczyński JJ (2005) Somatic embryogenesis of *Gentiana cruciata* (L.): Histological and ultrastructural changes in seedling hypocotyl explant. In Vitro Cell Dev Biol Plant 41:686–694. doi: 10.1079/IVP2005678
- Mikuła A, Tykarska T, Rybczyński JJ, Kuras M (2002) Ultrastructural analysis of initial stages of differentiation of root explants of *Gentiana cruciata* seedlings. Acta Soc Bot Pol 71:287–297. doi: 10.5586/asbp.2002.034
- Mikula A, Tykarska T, Zielinska M, Kuras M, Rybczynski JJ (2004) Ultrastructural changes in zygotic embryos and somatic embryogenesis of *Gentiana punctata* L. during callus formation and somatic embryogenesis. Acta Biol Cracov Ser Bot 46:109–120.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Naing AH, Min JS, Park KI, Chung MY, Lim SH, Lim KB, Kim CK (2013) Primary and secondary somatic embryogenesis in *Chrysanthemum* (*Chrysanthemum morifolium*) cv. “Baeksun” and assessment of ploidy stability of somatic embryogenesis process by flow cytometry. Acta Physiol Plant 35:2965–2974. doi: 10.1007/s11738-013-1328-4
- Namasivayam P (2007) Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. Plant Cell Tiss Organ Cult 90:1–8. doi: 10.1007/s11240-007-9249-9
- Neelakandan AK, Wang K (2012) Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. Plant Cell Rep 31:597–620. doi: 10.1007/s00299-011-1202-z
- Nhut DT, Tuan NS, Ngoc HM, Uyen PN, Don NT, Mai NT, Teixeira da Silva J (2006) Somatic embryogenesis induction from *in vitro* leaf culture of lisianthus (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.). Prop Ornament Plants 6:121–127.
- Nolan KE, Kurdyukov S, Rose RJ (2009) Expression of the *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1* (*SERK1*) gene is associated with developmental change in the life cycle of the model legume *Medicago truncatula*. J Exp Bot 60:1759–71. doi: 10.1093/jxb/erp046

- O'Brien TP, McCully ME (1981) The study of plant structure principles and selected methods. Termarcarphi Pty Ltda., Melbourne, Australia
- Ojtania AGW (2010) Effect of *meta*-topolin on *in vitro* propagation of *Pelargonium* × *Hortorum* and *Pelargonium* × *Hederaefolium* cultivars. *Acta Soc Bot Pol* 79:101–106.
- Orbović V, Čalović M, Vilorio Z, Nielsen B, Gmitter FG, Castle WS, Grosser JW (2007) Analysis of genetic variability in various tissue culture-derived lemon plant populations using RAPD and flow cytometry. *Euphytica* 161:329–335. doi: 10.1007/s10681-007-9559-3
- Otto F (1990) Flow cytometry. *Methods Cell Biol* 33:105–110. doi: 10.1016/S0091-679X(08)60516-6
- Paim-Pinto L. D, de Almeida Barros B, Viccini LF, de Campos SJM, da Silva LM, Otoni CW (2010) Ploidy stability of somatic embryogenesis-derived *Passiflora cincinnata* Mast. plants as assessed by flow cytometry. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 103:71–79. doi: 10.1007/s11240-010-9756-y
- Paim-Pinto Lopes D, Rocha de Almeida AM, Monteiro Rêgo M, da Silva LM., Jardim OE, Otoni WC (2011) Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) commercial populations. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 107:521–530. doi: 10.1007/s11240-011-0003-y
- Pasqual M, Pio LAS, Oliveira Lima AC, Soares R. JD (2012) Flow Cytometry Applied in Tissue Culture. In: Leva A, Rinaldi LMR (orgs) (Orgs.), Recent Advances in Plant *in vitro* Culture. InTech, p. 109–122. doi:10.5772/52760
- Pasternak TP, Prinsen E, Ayaydin F, Miskolczi P, Potters G, Asard H, Onckelen HAV, Dudits D, Fehér A (2002) The role of auxin, pH ,and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast derived cells of alfalfa. *Plant Physiol* 129:2002. doi: 10.1104/pp.000810.1
- Perez-Núñez MT, Chan JL, Saenz L, González T, Verdeil JL, Oropeza C (2006) Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) plumule explants. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 42:37–43. doi: 10.1079/IVP2005722
- Pérez-Núñez MT, Souza R, Sáenz L, Chan JL, Zúñiga-Aguilar JJ, Oropeza C (2009) Detection of a *SERK*-like gene in coconut and analysis of its expression during the formation of embryogenic callus and somatic embryos. *Plant Cell Rep* 28:11–19. doi: 10.1007/s00299-008-0616-8
- R Core Team (2014) Software R: A language and environment for statistical computing versão 3.0.3.

- Rakoczy-Trojanowska M (2002) The effects of growth regulators on somaclonal variation in rye (*Secale cereale* L.) and selection of somaclonal variants with increased agronomic traits. *Cell Mol Biol Lett* 7:1111–1120.
- Rathore MS, Paliwal N, Anand KGV, Agarwal PK (2014) Somatic embryogenesis and *in vitro* plantlet regeneration in *Salicornia brachiata* Roxb. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. doi: 10.1007/s11240-014-0571-8
- Rawlins TE, Takahashi WN (1952) Techniques of plant histochemistry and virology. The National Press, California.
- Rezaee F, Ghanati F, Boroujeni L (2012) Micropropagation of lisianthus (*Eustoma grandiflorum* L.) different explants to flowering onset. *Iran J Plant Physiol* 3:583–588.
- Rocha DI, Dornelas MC (2013) Molecular overview on plant somatic embryogenesis. *CAB Rev* 8:17. doi: 10.1079/PAVSNNR20138022
- Rocha DI, Monte-Bello CC, Dornelas MC (2014) Alternative induction of de novo shoot organogenesis or somatic embryogenesis from *in vitro* cultures of mature zygotic embryos of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) is modulated by the ratio between auxin and cytokinin in the medium. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. doi: 10.1007/s11240-014-0663-5
- Rocha DI, Vieira LM, Tanaka FAO, da Silva LC, Otoni WC (2012) Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. *Protoplasma* 249:747–58. doi: 10.1007/s00709-011-0318-x
- Rode C, Lindhorst K, Braun H-P, Winkelmann T (2012) From callus to embryo: a proteomic view on the development and maturation of somatic embryos in *Cyclamen persicum*. *Planta* 235:995–1011. doi: 10.1007/s00425-011-1554-1
- Rosa YBCJ, Bello CCM, Dornelas MC (2014) Species-dependent divergent responses to *in vitro* somatic embryo induction in *Passiflora* spp. *Plant Cell Tiss Organ Cult* doi: 10.1007/s11240-014-0580-7
- Rossi AAB, Clarindo WR, Carvalho CR, de Oliveira LO (2008) Karyotype and nuclear DNA content of *Psychotria ipecacuanha*: a medicinal species. *Cytologia* (Tokyo) 73:53–60. doi: 10.1508/cytologia.73.53
- Ruffoni B, Damiano C, Massabò F, Esposito P (1990) Organogenesis and embriogenesis in *lisianthus russellianus* Hook. *Acta Hort* 280:83–88.
- Sahijram L, Soneji JR, Bollamma KT (2003) Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 39:551–556. doi: 10.1079/IVP2003467

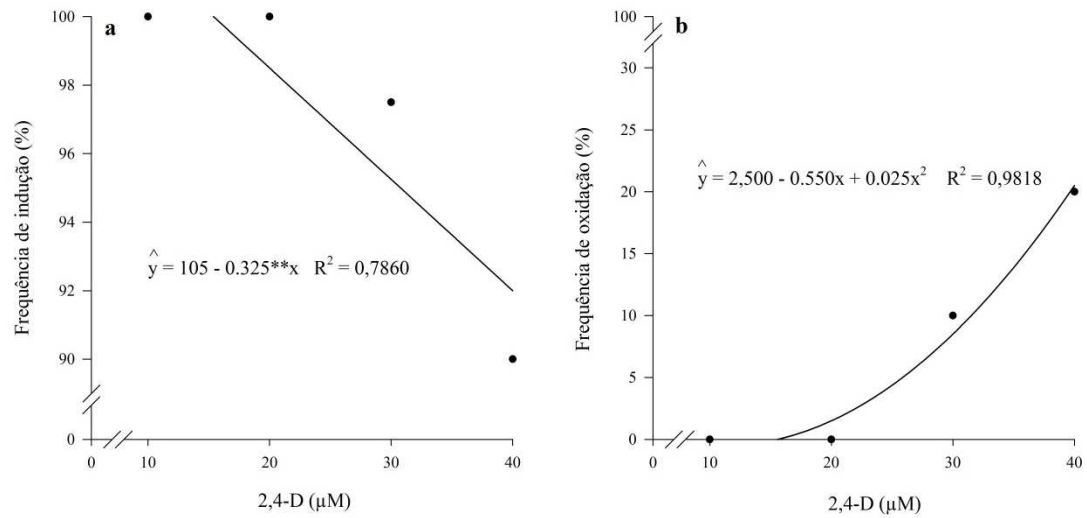
- Sallandrouze A, Faurobert M, El Maataoui M, Espagnac H (1999) Two-dimensional electrophoretic analysis of proteins associated with somatic embryogenesis development in *Cupressus sempervirens* L. Electrophoresis 20:1109–19. doi: 10.1002/(SICI)1522-2683(19990101)20:4/5<1109::AID-ELPS1109>3.0.CO;2-4
- Santos M, Romano E, Yotoko KSC, Tinoco MLP, Dias BBA, Aragão FJL (2005) Characterisation of the cacao *somatic embryogenesis receptor-like kinase (SERK)* gene expressed during somatic embryogenesis. Plant Sci 168:723–729. doi: 10.1016/j.plantsci.2004.10.004
- Savona M, Mattioli R, Nigro S, Falasca G, Della Rovere F, Costantino P, De Vries S, Ruffoni B, Trovato M, Altamura MM (2012) Two SERK genes are markers of pluripotency in *Cyclamen persicum* Mill. J Exp Bot 63:471–488. doi: 10.1093/jxb/err295
- Schmidt ED, Guzzo F, Toonen MA, de Vries SC (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. Development 124:2049–2062.
- Schwendiman J (1988) Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm *Elaeis guineensis*. Ann Bot 62:43–52.
- Shang HH, Liu CL, Zhang CJ, Li FL, Hong WD, Li FG (2009) Histological and ultrastructural observation reveals significant cellular differences between *Agrobacterium* transformed embryogenic and non-embryogenic calli of Cotton. J Integr Plant Biol 51:456–465. doi: 10.1111/j.1744-7909.2009.00824.x
- Sharifi G, Ebrahimzadeh H, Ghareyazie B, Gharechahi J, Vatankhah E (2012) Identification of differentially accumulated proteins associated with embryogenic and non-embryogenic calli in saffron (*Crocus sativus* L.). Proteome Sci 10:3. doi: 10.1186/1477-5956-10-3
- Sharma SK, Millam S, Hein I, Bryan GJ (2008) Cloning and molecular characterisation of a potato *SERK* gene transcriptionally induced during initiation of somatic embryogenesis. Planta 228:319–330. doi: 10.1007/s00425-008-0739-8
- Shen X, Chen J, Kane ME, Henny RJ (2007) Assessment of somaclonal variation in *Dieffenbachia* plants regenerated through indirect shoot organogenesis. Plant Cell Tissue Organ Cult 91:21–27. doi: 10.1007/s11240-007-9273-9
- Shibli RA, Duwayri MA, Sawwan JS, Shatnawi MA, Al-Qudah TS (2012) Regeneration via somatic embryogenesis of the endangered wild arum (*Arum palaestinum*). In Vitro Cell Dev Biol Plant 48:335–340. doi: 10.1007/s11627-012-9438-z

- Silva AT, Barduche D, do Livramento KG, Ligterink W, Paiva LV (2014) Characterization of a putative *Serk-like* ortholog in embryogenic cell suspension cultures of *Coffea arabica* L. Plant Mol Biol Report 32:176–184. doi: 10.1007/s11105-013-0632-x
- Silva CR, Zanderluce G, Scherwinski-Pereira JE (2013) The histodifferentiation events involved during the acquisition and development of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Plant Growth Regul 72:67–80. doi: 10.1007/s10725-013-9837-0
- Silva ML, Pinto DLP, Guerra MP, Floh EIS, Bruckner CH, Otoni WC (2009) A novel regeneration system for a wild passion fruit species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. Plant Cell Tiss Organ Cult 99:47–54. doi: 10.1007/s11240-009-9574-2
- Silva TCR, Carvalho CR (2013) Vertical heterogeneity of DNA ploidy level assessed by flow cytometry in calli of *Passiflora cincinnata*. In Vitro Cell Dev Biol Plant 50:158–165. doi: 10.1007/s11627-013-9582-0
- Sivanesan I, Lim MY, Jeong BR (2011) Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf and petiole explants of *Campanula punctata* Lam. var. *rubriflora* Makino. Plant Cell Tiss Organ Cult 107:365–369. doi: 10.1007/s11240-011-9983-x
- Smertenko A, Bozhkov P V (2014) Somatic embryogenesis: life and death processes during apical-basal patterning. J Exp Bot 65:1343–60. doi: 10.1093/jxb/eru005
- Somleva MN, Schmidt EDL, de Vries SC (2000) Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by SERK expression. Plant Cell Rep 19:718–726. doi: 10.1007/s002999900169
- Soundar Raju C, Kathiravan K, Aslam A, Shajahan A (2012) An efficient regeneration system via somatic embryogenesis in mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.). Plant Cell Tiss Organ Cult 112:387–393. doi: 10.1007/s11240-012-0244-4
- Stamp JA (1987) Somatic embryogenesis in cassava: the anatomy and morphology of the regeneration process. Ann Bot 59:451–459.
- Stanišić M, Raspor M, Ninković S, Milošević S, Čalić D, Bohanec B, Trifunović M, Petrić M, Subotić A, Jevremović S (2015) Clonal fidelity of *Iris sibirica* plants regenerated by somatic embryogenesis and organogenesis in leaf-base culture — RAPD and flow cytometer analyses. South Afr J Bot 96:42–52. doi: 10.1016/j.sajb.2014.10.014
- Steiner N, Santa-Catarina C, Guerra MP, Cutri L, Dornelas MC, Floh EIS (2012) A gymnosperm homolog of SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE-1 (*SERK1*) is expressed during somatic embryogenesis. Plant Cell Tiss Organ Cult 109:41–50. doi: 10.1007/s11240-011-0071-z

- Suprasanna P, Sidha M (2013) Somatic Embryogenesis Receptor Kinase (*SERK*) and regulation of embryogenesis in plants. In: Aslam J, Srivastava PS, Sharma MP (orgs) Somatic Embryogenesis and Gene Expression. Narosa, India, p. 188–200.
- Taiz L, Zeiger E (2004) Células Vegetais. In: Fisiologia vegetal. Artmed, Porto Alegre, p. 29–55.
- Tan BC, Chin CF, Liddell S, Alderson P (2013) Proteomic analysis of callus development in *Vanilla planifolia* Andrews. Plant Mol Biol Rep 31:1220–1229. doi: 10.1007/s11105-013-0590-3
- Tarré E, Magioli C, Margis-Pinheiro M, Sachetto-Martins G, Mansur E, Santiago-Fernandes LDR (2004) *In vitro* somatic embryogenesis and adventitious root initiation have a common origin in eggplant (*Solanum melongena* L.). Rev Bras Botânica 27:79–84. doi: 10.1590/S0100-84042004000100010
- Thomas C, Meyer D, Himber C, Steinmetz A (2004) Spatial expression of a sunflower *SERK* gene during induction of somatic embryogenesis and shoot organogenesis. Plant Physiol Biochem 42:35–42. doi: 10.1016/j.plaphy.2003.10.008
- Valero-Aracama C, Kane ME, Wilson SB, Philman NL (2009) Substitution of benzyladenine with *meta*-topolin during shoot multiplication increases acclimatization of difficult- and easy-to-acclimatize sea oats (*Uniola paniculata* L.) genotypes. Plant Growth Regul 60:43–49. doi: 10.1007/s10725-009-9417-5
- Vidal CB (1977) Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. Cell Mol Biol 22:45–64.
- Visarada KBRs, Sailaja M, Sarma NP (2002) Effect of callus induction media on morphology of embryogenic calli in rice genotypes. Biol Plant 45:495–502. doi: 10.1023/A:1022323221513
- Von Arnold S (2008) Somatic Embryogenesis. In: George EF, Hall MA, Klerk G-J De (orgs) Plant Propagation by Tissue Culture, 3rd edn. Springer Netherlands, p. 335–354. doi:10.1007/978-1-4020-5005-3_1
- Werbrouck S (2010) Merits and drawbacks of new aromatic cytokinins in plant tissue culture. Acta Hort 865:103–108.
- Werbrouck S, Strnad M, Van Onckelen HA, Debergh PC (1996) *Meta*-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? Physiol Plant 98:291–297. doi: 10.1034/j.1399-3054.1996.980210.x

- Yang C, Zhao T, Yu D, Gai J (2011a) Isolation and functional characterization of a SERK gene from soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Plant Mol Biol Report* 29:334–344. doi: 10.1007/s11105-010-0235-8
- Yang X, Lü J, da Silva JAT, Ma G (2011b) Somatic embryogenesis and shoot organogenesis from leaf explants of *Primulina tabacum*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 109:213–221. doi: 10.1007/s11240-011-0087-4
- Zakizadeh H, Stummann BM, Lütken H, Müller R (2010) Isolation and characterization of four somatic embryogenesis receptor-like kinase (*RhSERK*) genes from miniature potted rose (*Rosa hybrida* cv. Linda). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 101:331–338. doi: 10.1007/s11240-010-9693-9
- Zavattieri MA, Frederico AM, Lima M, Sabino R, Arnholdt-Schmitt B (2010) Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. *Electron J Biotechnol* 13:1–9. doi: 10.2225/vol13-issue1-fulltext-4
- Zhang S, Liu X, Lin Y, Xie G, Fu F, Liu H, Wang J, Gao S, Lan H, Rong T (2011) Characterization of a *ZmSERK* gene and its relationship to somatic embryogenesis in a maize culture. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 105:29–37. doi: 10.1007/s11240-010-9834-1
- Zhao J, Cui J, Liu J, Liao F, Henny RJ, Chen J (2012) Direct somatic embryogenesis from leaf and petiole explants of *Spathiphyllum* “Supreme” and analysis of regenerants using flow cytometry. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 110:239–249. doi: 10.1007/s11240-012-0146-5
- Zhou X, Mo X, Qu S, Tian M, Wu X, Wu M, Li J, Luo Y, Wang J, Gui M (2014) Comparison of lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) cultivars based on the selected regeneration media using anther culture. *Hortic Environ Biotechnol* 55:125–128. doi: 10.1007/s13580-014-0013-x
- Zimmerman JL (1993) Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. *Plant Cell* 5:1411–1423. doi: 10.1105/tpc.5.10.1411
- Zimmermann MJ (2010) Embriogênese somática. In: Cid Barreto LP (org) *Cultivo in vitro de plantas*. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF, p. 67–101.

FIGURAS E LEGENDAS



**Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

Fig. 1 (a) Frequência de indução, (b) taxa de oxidação de explantes foliares de *Eustoma grandiflorum* em função da concentração de 2,4-D no meio de indução de embriogênese somática, avaliadas aos 30 d de cultivo *in vitro*.

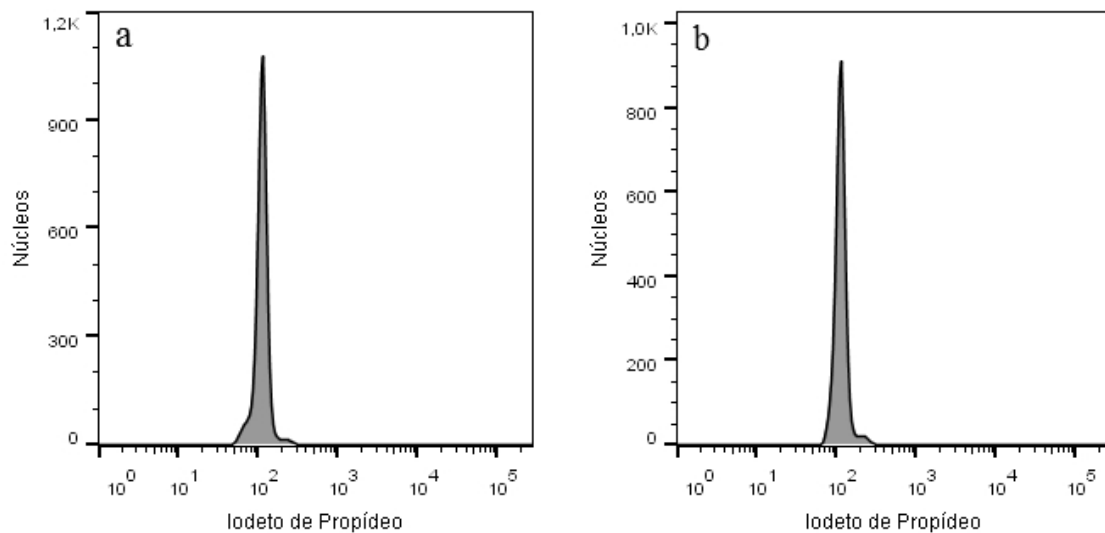


Fig. 2 Histogramas representativos de citometria de fluxo em escala logarítmica de núcleos corados com IP a partir de folha de padrão diploide e amostras de plantas regeneradas a partir de ES de *Eustoma grandiflorum* (a) Histograma apresentando pico G_0/G_1 do padrão externo (canal 115, $2C=2x$), (b) histograma apresentando pico G_0/G_1 (canal 110) das amostras diploides obtidas via embriogênese somática.

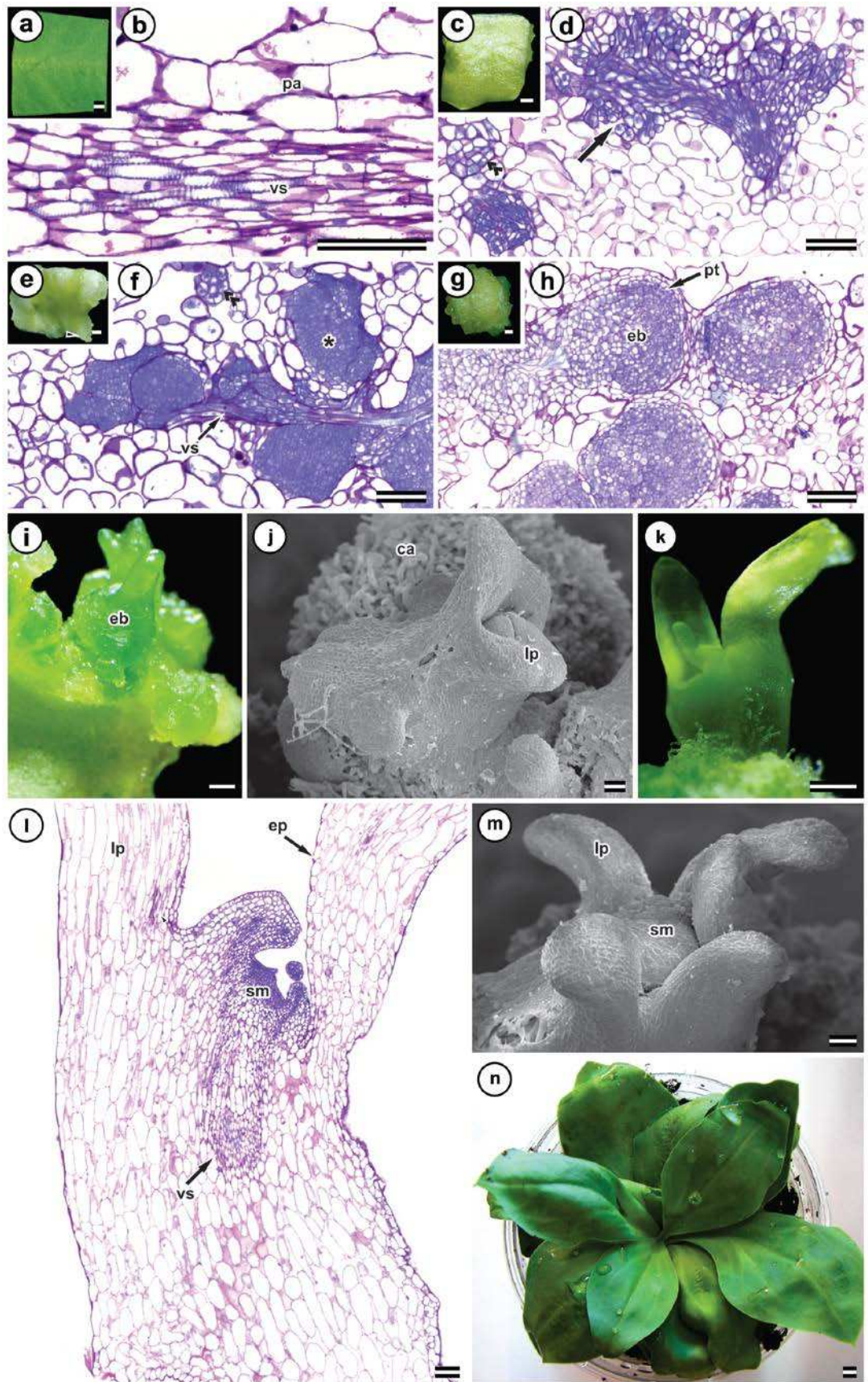


Fig. 3 Sequência de eventos anatômicos do processo de embriogênese a partir de segmentos foliares de vitroplantas de *Eustoma grandiflorum*, caracterizada mediante estereomicroscopia, microscopia de luz e eletrônica de varredura. Explante inicial antes do cultivo *in vitro* em meio MS sem regulador de crescimento (tempo 0) (a, b); Detalhe folha (a); Seção longitudinal: células do mesófilo e sistema vascular (b); 10 d após a introdução no meio de indução com 10 μ M de 2,4-D (c, d); Início da calogênese (►) (c); Divisões anticliniais (seta), formação de zonas pro-embriogênicas (>>) (d); 20 d no meio de indução (e, f); desenvolvimento da calogênese (e); Diferenciação de pró-embriões (*) (f); 30 d após a introdução no meio de indução (g, h); Embriões somáticos com protoderme (h); embriões somáticos em estágio cotiledonar com 25 d após a introdução do material no meio de maturação: MS com 2 μ M de BA (i, j, k, l, m); Iniciando o desenvolvimento dos primórdios foliares (i); Embrião somático em desenvolvimento (j); embrião somático em estágio cotiledonar (k); Observa-se primórdios foliares, meristema apical, epiderme e sistema vascular (l); Detalhe do domo apical com primórdios foliares (m); Planta aclimatizada com 30 d (n). *Abreviaturas*: ca: calos; eb: embrião; ep: epiderme; lp: primórdio foliar; pa: parênquima; pt: protoderme; sm: meristema apical; vs: sistema vascular. Barras: a, c, e, g, i, k, m, p - 500 μ m; b, d, f, h, j, l, n, o: 100 μ m.

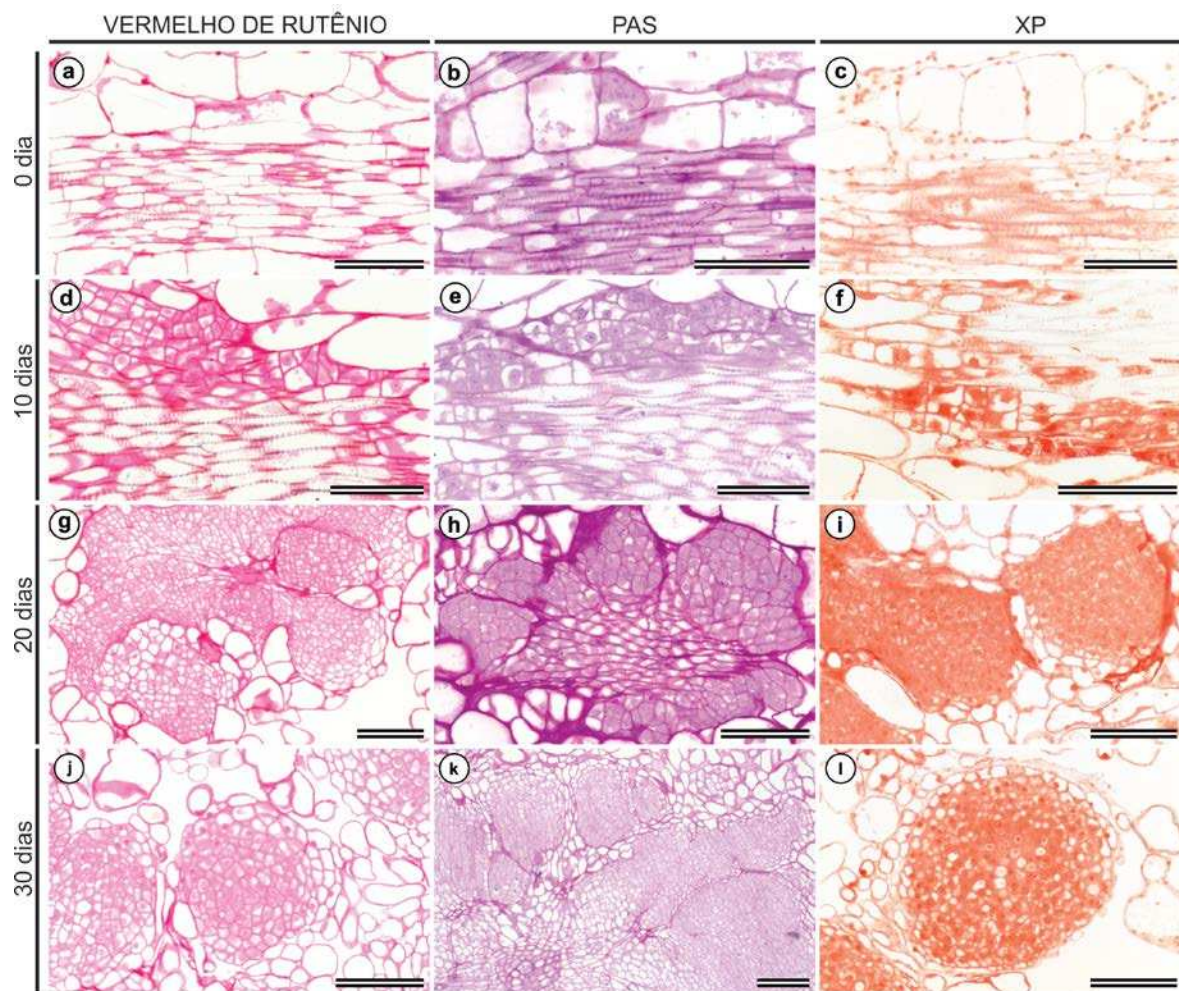


Fig. 4 Estudos histoquímicos da embriogênese somática a partir de explantes foliares de *Eustoma grandiflorum*. Secções longitudinais submetidas a vermelho de rutênio (a, d, g, j), ácido periódico/reagente de Schiff – PAS (b, e, h, k) e XP (c, f, i, l). Reação positiva para grãos de amido e carboidratos totais na parede celular, corados com PAS (b, e, h, k). Proteínas coradas positivamente de vermelho (c, f, i, l). Barras: a-l – 100 μ m

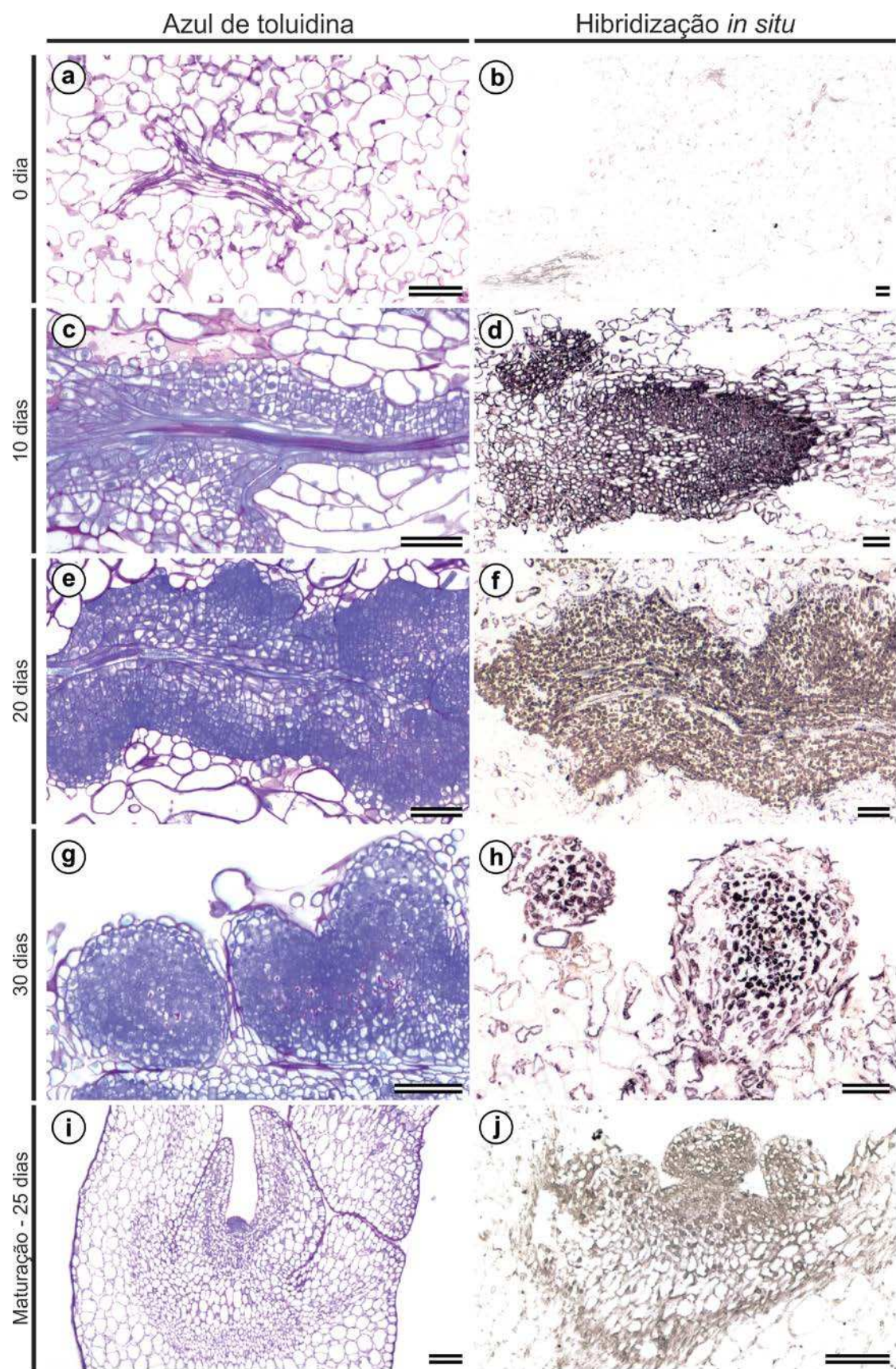


Fig. 5 Localização dos transcritos do gene *SERK* por hibridização *in situ* de segmentos foliares de *E. grandiflorum*. Explante no tempo 0 (**a, b**); Secção longitudinal: feixe vascular e parênquima (**a**); Secção longitudinal: hibridizado com sonda anti-senso. (**b**); Após 10 d da introdução no meio de indução (**c, d**); Divisões anticlinais nas células perivasculares e zonas pró-embriogênicas (**c**); zonas pró-embriogênicas: hibridizado com sonda anti-senso (**d**); Após 20 d no meio de indução (**e, f**); Desenvolvimento de zonas pró-embriogênicas (**e**); Zonas pré-embriogênicas: hibridizado com sonda anti-senso (**f**); Após 30 d da introdução no meio de indução (**g, h**); Embriões somáticos em estágio globular (**g**); Embriões somáticos em estágio globular: hibridizado com sonda anti-senso (**h**); Após 25 d da introdução do material no meio de maturação (**i, j**); Embrião maduro com 25 d (**i**); Embrião maduro com 25 d: hibridizado com sonda anti-senso (**j**) Barras: a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l – 100

CAPÍTULO 2: EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM EXPLANTES RADICULARES DE LISIANTHUS (*Eustoma grandiflorum*): CARACTERIZAÇÃO MORFO-ANATÔMICA, HISTOQUÍMICA E EXPRESSÃO DO GENE *SERK*

RESUMO - A embriogênese somática possui papel de destaque como via morfogênica eficiente para gerar plantas em larga escala, bem como para a compreensão dos aspectos morfo-fisiológicos e moleculares no processo de desenvolvimento das plantas. Dessa forma, o objetivo foi estabelecer um protocolo de embriogênese somática a partir de explantes radiculares de *E. grandiflorum*, comprovado a partir das mudanças citológicas, histoquímicas e moleculares nas diferentes fases de indução das culturas embriogênicas. Recomenda-se o uso de 10 μ M de 2,4-D por 40 d para o estabelecimento de calos embriogênicos. Para a fase de maturação, recomenda-se o uso de 2 μ M de BA para o completo desenvolvimento das vitroplantas. Foram observadas divisões celulares no sentido periclinal e anticlinal das células do periciclo ao longo da indução embriogênica, as quais deram origem aos embriões somáticos. Na fase de maturação observou-se desenvolvimento de cotilédones, meristema apical, sistema vascular e meristema radicular, demonstrando a similaridade morfológica com embriões zigóticos. Os testes histoquímicos indicaram a presença e mobilização de compostos de reserva ao longo do cultivo nas células parenquimáticas do córtex e em calos embriogênicos. Foram isolados duas sequências parciais de *SERK*, as quais constituem possíveis homólogos de *SERK1* e *SERK3*, provavelmente associados com aquisição de competência embriogênica das células somáticas. Através da hibridização *in situ*, foi detectada a presença dos transcritos de *SERK* com o início das divisões celulares na região do periciclo. O sinal de expressão de *SERK* aumentou de forma gradativa ao longo da indução embriogênica, sendo mais intenso nos pró-embriões até o completo desaparecimento no estágio globular. Os resultados obtidos no presente trabalho fornecem um protocolo eficiente de embriogênese somática a partir de explantes radiculares de *E. grandiflorum*, com informações detalhadas das mudanças anatômicas e histoquímicas, assim como caracterização da expressão dos genes *SERK* durante todo o processo. Os dados podem auxiliar em futuras pesquisas para transformação genética, bem como, para identificação de outros genes marcadores da embriogênese somática, assim como dos fatores envolvidos na transição embriogênica.

Palavras-chave: Explantes radiculares, expressão gênica, filogenia, hibridização *in situ*.

SOMATIC EMBRYOGENESIS FROM ROOT EXPLANTS OF LYSIANTHUS (*Eustoma grandiflorum*): MORPHO-ANATOMICAL AND HISTOCHEMICAL CHARACTERIATION AND EXPRESSION ANALYSIS OF *SERK* GENES

ABSTRACT –Somatic embryogenesis has played a relevant role due to its efficient system for large scale plant propagation, as well as for the understanding morphophysiological and molecular aspects of plant development. Thus, the aim of this study was to establish for the first time in this species a protocol of somatic embryogenesis from root explants of *Eustoma grandiflorum*, studying the cytological, histochemical and molecular changes at different stages of embryogenic cultures induction. The results suggest the use of 10 μ M de 2,4-D for 40 days to obtain embryogenic callus and the use of 2 BA μ M during maturation phase for the full development of the emblings. Cell divisions were observed in pariclinal and anticlinal plane of pericycle cells along the embryonic induction, giving rise to somatic embryos. During differentiation and maturation stages the morphological patterns apical and root meristem meristems, cotyledon and vascular system were similar to zygotic embryos. The histochemical analysis indicated the presence and mobilization of storage compounds along the somatic embryogenesis in the cortical parenchymatic cells and in embryogenic calli. Two partial sequences of possible homologs of *SERK1* and *SERK3* were isolated, and probably associated with acquisition of embryogenic competence of somatic cells. The presence of the *SERK* transcript was detected at the beginning of cell division in the pericycle region using *in situ* hybridization. The *SERK* expression signal increased gradually along the embryonic induction with a strong signal in the pro-embryos until the complete disappearance in the globular embryos. The results obtained in this study provide the first report of somatic embryogenesis from root explants of *E. grandiflorum*, with detailed of anatomical and histochemical studies, as well as characterization of the expression of genes *SERK* throughout the process. This study can be useful for future research in genetic transformation, as well as for the identification of other marker genes of somatic embryogenesis, and factors involved in embryogenic transition.

Keywords: Gene expression, *in situ* hybridization, phylogeny, root explants, *SERK* genes.

INTRODUÇÃO

O lisianthus, *Eustoma grandiflorum* pertencente à família Gentianaceae, é uma espécie ornamental originária da região sul dos Estados Unidos da América. O interesse pelo cultivo de lisianthus vem crescendo ao longo dos anos pela sua beleza e diversidade de cultivares existentes no mercado (Harbaugh 2007). Atualmente, os programas de melhoramento em lisianthus estão direcionados ao aumento da tolerância da espécie a temperaturas elevadas (menos sensíveis ao rosetamento) bem como às doenças (Harbaugh e Scott 2003). Além disso, busca-se aumento do vigor das mudas, maior uniformidade da floração e aumento da vida pós-colheita das flores (Dole e Wilkins 2005; Kaviani 2014).

E. grandiflorum pode ser propagada de forma sexuada e assexuada, sendo no último caso principalmente via cultura de tecidos (Griesbach et al. 1988). Dentre as principais vantagens de se propagar essa espécie por cultura de tecidos destaca-se a propagação em larga escala de plantas livres de pragas e doenças em período curto de tempo (Kaviani 2014). Deste modo, torna-se necessário disponibilizar procedimentos de propagação *in vitro* mais eficientes visando trabalhos futuros de transformação genética aumentando assim a oferta de genótipos elites para o cultivo a campo.

Entre as vias de regeneração *in vitro*, a embriogênese somática possui papel de destaque, já que apresenta um sistema eficiente para gerar plantas em larga escala, bem como para a compreensão dos aspectos morfo-fisiológicos e moleculares no processo de desenvolvimento das plantas (Fehér et al. 2003; Zhang et al. 2010; Otoni et al. 2013; Rai and Shekhawat 2013).

A embriogênese somática está dividida em duas fases: indução e maturação. Na fase de indução, células somáticas (totipotentes) adquirem competência embriogênica e proliferam-se como células embriogênicas e na fase de maturação, as células embriogênicas rediferenciam-se para formar embriões somáticos (Namasivayam 2007). As duas fases são independentes, entretanto a frequência de indução embriogênica não depende apenas das condições de cultivo, mas também do genótipo (cultivar/espécie), do tipo de explante, do estágio de desenvolvimento e de níveis endógenos de reguladores de crescimento (Carman 1990; Jiménez 2001; Jiménez 2005; Namasivayam 2007; Fehér 2008).

Quanto ao tipo de explante, o uso de raízes isoladas tem sido bastante utilizado na morfogênese *in vitro*. Ao contrário de outros explantes, as raízes exibem elevado grau de

estabilidade genética sugerindo o uso do cultivo de raízes para criopreservação, por exemplo (Von Arnold 2008). Além disso, a fácil manipulação do material o torna atrativo para automação do processo, gerando elevado número de embriões somáticos em curto período de tempo (Yang et al. 2009). Porém, as plantas apresentam elevado grau de especificidade genética na capacidade de se regenerar a partir de culturas isoladas de raízes limitando dessa forma, o uso deste explante nas espécies (Von Arnold 2008). A indução de embriogênese somática, assim como a diferenciação e maturação dos embriões a partir de explantes radiculares foi descrito pra espécies como: *Spinacia oleracea* (Komai et al. 1995; Komai et al. 1996a; Komai et al. 1996b), *Dioscorea alata* (Twyford e Mantell 1996), *Lotus corniculatus* (Akashi et al. 1998), *Gentiana pannonica* (Mikuła e Rybczyński 2001), *Medicago truncatula* (Iantcheva et al. 2005), *Eleutherococcus koreanum* (Park et al. 2005), *Piper nigrum* (Nair e Gupta 2006), *Gentiana kurroo* (Fiuk e Rybczyński 2007a), *Brassica oleracea* (Yang et al. 2009), *Hevea brasiliensis* (Zhou et al. 2010), *Taverniera cuneifolia* (Awad et al. 2011), *Gentiana macrophylla* (Wu et al. 2011), *Salvia miltiorrhiza* (Wang et al. 2013), entre outras.

Para indução de embriogênese somática em *E. grandiflorum* foram utilizados como explantes discos foliares (Ruffoni et al. 1990; Nhut et al. 2006), assim como cultura de anteras (Wan et al. 2009), no entanto, o uso de explantes radiculares ainda não foi relatado para esta espécie.

Na indução e maturação da embriogênese somática, via de regra, é fundamental a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura (Gaj 2004; Zavattieri et al. 2010). Normalmente, os principais reguladores de crescimento envolvidos no controle da divisão celular e diferenciação dos tecidos são as auxinas e citocininas (Fehér et al. 2003; Jiménez e Thomas 2006). Para a etapa final de desenvolvimento do embrião (etapas de maturação e germinação), vem-se adicionando GA₃ ao meio de cultura para proporcionar a rápida germinação dos embriões somáticos (Zlenko et al. 2002).

Estudos anatômicos têm fornecido descrições detalhadas das alterações envolvidas na aquisição de competência embriogênica e histodiferenciação de embriões somáticos provenientes de explantes radiculares, por exemplo em *Chicorium* spp. (Dubois et al. 1990) e *Brassica oleracea* L. (Yang et al. 2009). Além disso, métodos histoquímicos permitem o monitoramento da mobilização e sínteses de compostos de reserva durante o

desenvolvimento embriogênico, possibilitando o reconhecimento de regiões e/ou tecidos de elevada demanda energética (Branca et al. 1994; Cangahuala-Inocente et al. 2004; Cangahuala-Inocente et al. 2009; Rocha et al. 2012a).

O entendimento de mecanismos básicos da transição de células somáticas para embriogênicas, a determinação da origem celular e de grupos de células envolvidas na regeneração são essenciais tanto para o desenvolvimento de protocolos eficientes (Fehér et al. 2003; Fehér 2005; Perez-Núñez et al. 2006) quanto para a validação do uso da embriogênese somática em programas de transformação genética (Shang et al. 2009). O processo de aquisição da competência embriogênica de células somáticas envolve a reprogramação dos padrões da expressão gênica, bem como alterações na morfologia, fisiologia e do metabolismo (Zimmerman 1993; Suprasanna e Sidha 2013). Assim, as mudanças dependem da regulação da expressão de genes específicos relacionados aos diferentes estádios do desenvolvimento embriogênico (Zimmerman 1993; Suprasanna e Sidha 2013), permitindo o estudo de aspectos morfo-fisiológicos e moleculares envolvidos na diferenciação celular e no desenvolvimento embrionário.

O gene *SERK* (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase*) originalmente identificado em culturas embriogênicas de *Daucus carota* por Schmidt (1997), faz parte de uma família multigênica de receptores de proteínas do tipo quinase (RLK- Receptor-like kinase). Exercem um papel importante no controle de processos no desenvolvimento das plantas (Cock et al. 2002). Assim também, desempenham papel fundamental na tradução de sinais no desenvolvimento da embriogênese zigótica e somática em resposta as condições ambientais (Schmidt et al. 1997; Hecht et al. 2001; Baudino et al. 2001; Cairney et al. 2006; Steiner et al. 2012)

Vários genes da família *SERK* foram isolados em gimnospermas (Steiner et al. 2012) e angiospermas: monocotiledôneas (Somleva et al. 2000; Baudino et al. 2001; Singla et al. 2008; Rekik et al. 2013; Huang et al. 2014; Ma et al. 2014; Podio et al. 2014) e eudicotiledôneas (Hecht et al. 2001; Sharma et al. 2008; Nolan et al. 2009; Kedong et al. 2011; Talapatra et al. 2014; Li et al. 2014). Assim, a caracterização da expressão de homólogos de *SERK* serve como marcadores de células com competência embriogênica, uma vez que este gene pode ser um componente das rotas de sinalização para a embriogênese (Fehér et al. 2003). Esses indícios levantam a hipótese de que os genes *SERK*

possam estar envolvidos na aquisição de competência embriogênica durante a embriogênese somática de explantes radiculares de *E. grandiflorum*. Desta maneira, espera-se que o uso dos gene *SERK*, como marcador do estágio embriogênico, permita maior eficiência nos trabalhos de desenvolvimento de protocolos de embriogênese somática para *E. grandiflorum* e nos trabalhos visando à transformação genética.

Dessa forma, o objetivo do trabalho foi propor um protocolo eficiente de embriogênese somática a partir de explantes radiculares de *E. grandiflorum*, comprovado a partir das mudanças citológicas, histoquímicas e moleculares nas diferentes fases de indução das culturas embriogênicas, uma vez que ainda não foram propostos para esta espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e condições de cultivo

Foram utilizados como material vegetal sementes de *E. grandiflorum* cv. Abc 2-3 Rose Ball™, previamente desinfestadas em etanol 70 % (v/v) por 1 min, seguida por imersão em hipoclorito de sódio comercial 2,5 % (v/v) com 2 gotas de Tween-20 a 0,1 % (v/v) por 15 min. Em seguida, foi feita tríplice lavagem em água deionizada por 5 min cada.

As sementes foram inoculadas em placas de Petri (90 x 15 mm, J. Prolab, Brasil), contendo meio de cultura constituído por sais MS (Murashige e Skoog 1962) meia força, complexo vitamínico MS, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 20 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar Merck®. O pH foi ajustado para 5,7 anteriormente à autoclavagem a 121 °C e 1,5 atm. As placas foram acondicionadas em sala de crescimento sob temperatura de 27 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h e irradiância de 36 µmol m⁻² s⁻¹, fornecida por duas lâmpadas fluorescentes de 20 W (Osram® luz do dia, Brasil) durante 30 d.

Indução de calos embriogênicos

Como explantes foram utilizados segmentos radiculares obtidos a partir do seccionamento de plântulas previamente germinadas *in vitro*. As raízes foram excisadas e subdivididas em fragmentos de, aproximadamente, 10 mm. O ápice radicular e os segmentos adjacentes ao hipocótilo não foram utilizados.

Os segmentos radiculares foram inoculados em meio de cultura básico contendo sais MS, 2 % de sacarose e suplementado com diferentes concentrações (0, 10, 20, 30 ou 40 µM) de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) ou ácido naftalenoacético (ANA). Nesta fase de indução de calos embriogênicos, o material foi mantido no escuro por 40 d em sala de crescimento, com temperatura de 27 ± 2 °C.

Diferenciação e maturação dos embriões somáticos

Após 40, 50 ou 60 d na fase de indução, ou seja, em meio MS suplementado com 10 µM de 2,4-D (baseado no experimento de indução de culturas embriogênicas), os calos obtidos foram transferidos para o meio de diferenciação e maturação de embriões somáticos, composto de sais MS com 2 % de sacarose e diferentes concentrações (2 ou 4 µM) de 6-benzilaminopurina (BA) ou (1,5 ou 3,0 µM) de ácido giberélico (GA₃). Nesta fase as culturas embriogênicas foram mantidas em sala de crescimento, sob temperatura de

27 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 36 μmol m⁻² s⁻¹, fornecida por duas lâmpadas fluorescentes de 20 W.

Nas fases de indução e de maturação dos embriões somáticos, a captura das imagens foi realizada em fotoestereoscópio (Olympus SZX7) com câmera digital acoplada (modelo Olympus EVOLT-330).

Delineamento experimental e análises estatísticas

Para a fase de indução de culturas embriogênicas, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cinco tratamentos (0, 10, 20, 30 ou 40 μM de 2,4-D), oito repetições cada, e a unidade experimental composta por uma placa de Petri contendo cinco raízes/repetição. Foram avaliadas as seguintes variáveis:

Frequência de indução (%): $\frac{\text{número de explantes com calos embriogênicos}}{\text{número de explantes totais}} \times 100$;

Taxa de oxidação (%): $\frac{\text{número de explantes oxidados}}{\text{número de explantes totais}} \times 100$.

Os dados foram submetidos à análise de regressão, sendo selecionadas dentro da equação de regressão, aquelas de efeito significativo, pelo teste F, a 1 e 5 % de significância.

Para a fase de diferenciação e maturação dos embriões somáticos, foi utilizado o delineamento blocos ao acaso (DBC), em esquema fatorial (3x5), sendo três tempos de permanência em meio de indução de culturas embriogênicas (40, 50 e 60 d), e cinco tratamentos (controle – s/RC, c/ 2 μM BA; c/ 4 μM BA; c/ 1,5 μM GA₃ e c/ 3 μM GA₃), totalizando 15 tratamentos, com quatro repetições, e a unidade experimental composta por uma placa de Petri contendo quatro calos embriogênicos/repetição. Foram avaliadas as seguintes variáveis: Número de embriões formados (estádios globular, torpedo, cotiledonar e embriões germinados); Massa fresca e seca total de embriões somáticos regenerados;

Frequência de maturação (%): $\frac{\text{número de explantes com embriões maduros}}{\text{número de explantes totais}} \times 100$ e

Porcentagem de biomassa fresca e seca de embriões (%): $\frac{\text{porcentagem da razão massa fresca ou seca dos embriões}}{\text{massa fresca ou seca total do explante}} \times 100$

Todas as variáveis foram submetidas à análise de variância, e as médias comparadas utilizando-se o teste de Tukey a 5 % de significância. As análises estatísticas das etapas de indução de calos embriogênicos e diferenciação e maturação dos embriões somáticos foram

realizadas utilizando-se o *software* R versão 3.0.3 (R Core Team 2014) com auxílio do pacote ExpDes versão 1.1.2 (Ferreira et al. 2013) e do pacote Easyanova (Arnhold 2014). Para as análises de indução embriogênica foi calculada a média de frequência de indução e da taxa de oxidação e os valores plotados no software Sigma Plot[®] (versão 11.0).

Caracterização anatômica e histoquímica

Microscopia de luz e caracterização histoquímica

Para caracterização estrutural e histoquímica, amostras de calos embriogênicos foram coletadas a cada 10 d, durante o processo de indução (40 d), e ao final do ciclo de maturação (30 d) fixadas em solução de Karnovsky (1965). Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série etílica (10 a 95 %), e incluídas em resina metacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha). Secções longitudinais com 5 µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA). As mesmas foram coradas com azul de toluidina (pH 3,2) (O'Brien e McCully 1981) para caracterização estrutural, com Xylidine Ponceau (Vidal 1977) para detecção de proteínas totais, com ácido periódico–reagente de Schiff (Feder e O'Brien 1968) para polissacarídeos totais, com lugol para evidenciar amido (Johansen 1940), com vermelho de rutênio para comprovar a presença de substâncias pécticas (Rawlins e Takahashi 1952) e com vermelho neutro (Kirk 1970) para detecção de lipídeos.

Nesta fase, a captura de imagens foi realizada em microscópio de luz e fluorescência (AX70TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japan) com câmera digital acoplada (modelo Olympus E-330). As secções submetidas ao vermelho neutro foram examinadas em luz UV com filtro de excitação azul (BP 450 - 490 nm).

Caracterização micromorfológica: microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Amostras fixadas em Karnovsky foram pré-tratadas durante duas horas com solução de tetróxido de ósmio e cacodilato (relação 1:1, v/v). Em seguida, foram desidratadas em série de acetona e secas em ponto crítico com CO₂ (Bozzola e Russell 1992), utilizando equipamento Bal-tec (modelo CPD 030, Baltec, Bralzers, Alemanha). Posteriormente, foram fixadas em *stubs*, seguida da deposição metalizada com ouro, em equipamento

Balzers de congelamento a seco (modelo FDU 010, BalTec, Balzers, Liechtenstein), acoplado ao conjunto de pulverização catódica (modelo SCA-010).

As observações e registros fotográficos foram realizados em microscópio eletrônico de varredura (LEO 1430 VP, Zeiss, Cambridge, Reino Unido) e as imagens processadas digitalmente.

Caracterização da expressão dos genes *SERK*

Extração de RNA total e síntese de cDNA

Amostras de calos embriogênicos oriundos de explantes radiculares, com 30 d em meio de indução de embriogênese somática, foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, sendo armazenadas em freezer a -80 °C até o momento do uso.

O RNA total foi extraído utilizando Tris-Reagent[®], de acordo com recomendações do fabricante. A quantificação do RNA foi realizada em NanoDrop ND-1000 (NanoDrop TechnologiesTM) com absorvância de 260 nm; e a integridade das amostras verificada por eletroforese em gel de agarose (livre de RNase) a 1,2 %. O cDNA fita simples foi sintetizado a partir de 3 µg de RNA total, utilizando o kit SuperScriptTM II Reverse transcriptase (InvitrogenTM), conforme recomendações do fabricante.

*Amplificação e clonagem da sequência codificadora de *SERK**

O cDNA sintetizado foi utilizado como molde para a amplificação das sequências parciais de regiões codificadoras dos genes *SERK* expressos durante a embriogênese somática em *Eustoma grandiflorum*. Para amplificação do gene foi utilizada uma combinação de iniciadores degenerados desenhados por Baudino et al. (2001). As sequências e combinações dos iniciadores utilizados estão contidos na tabela 1.

Tabela 1. Iniciadores degenerados utilizados para amplificação de *SERK* (A) em cDNA de *Eustoma grandiflorum* e localização na proteína.

Iniciador	Sequência	Domínio estrutural
<i>SERK</i>		
S1	5'TGTHACRTGGGTRTCCTTGARTCCAT3'	Domínio quinase (exon VII)
S5	5'ATGCACTSACYAATATYACWACYCTTCAAG3'	LRR

W = A ou T; R = A ou G; M = A ou C; Y = C ou T; H = A ou C ou T; S = C ou G; S1 (iniciador reverso); S5 (iniciador direto).

A reação de PCR ocorreu em um volume final de 50 µL contendo: 2,0 µL de cDNA concentrado, 5 µL de tampão 10X, 1 µL de dNTPs (10 mM), 2 µL de MgSO₄ (50 mM),

1 µL de cada iniciador (10 µM) e 0,2 µL de DNA polimerase (Platinum[®] Taq DNA High Fidelity 5U µL⁻¹, Invitrogen[™]).

O programa de amplificação utilizado foi: desnaturação a 94 °C por 5 min, seguidos por 35 ciclos a 94 °C (1 min), 50 °C (1 min) e uma extensão final a 68 °C por 5 min.

Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1 % e purificados utilizando o Kit Wizard[®] SV Gel e PCR clean up (Promega, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Os fragmentos foram ligados no vetor pGEM -T Easy[®] Vector Systems (Promega, USA) e introduzidos em células ultracompetentes (DH5α) por choque térmico (Sambrook e Russel 2001). O DNA plasmidial das colônias brancas selecionadas foram purificadas pelo método de lise alcalina, utilizando o kit Illustra PlasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare). A confirmação da presença do inserto, foi verificada por digestão do DNA plasmidial com a enzima *EcoRI* (Fermentas).

Sequenciamento dos clones e análise das sequências

Foram selecionados 12 clones os quais foram sequenciados pela empresa Macrogen, localizada na Coreia do Sul. O sequenciamento foi feito nos sentidos senso e anti-senso utilizando-se os iniciadores universais M13 e SP6, respectivamente.

Os cromatogramas obtidos foram processados e a montagem dos *consensus* executada pelo programa CodonCode[™] Aligner-Software (LI-COR, Inc., Lincoln, USA) e a montagem dos *consensus* executada no programa PHRED (Ewing et al. 1998). As sequências com pelo menos 100 bases e com o valor de PHRED maior ou igual a 20 foram consideradas para a montagem. O programa CROSSMATCH foi utilizado para a limpeza dos vetores e a montagem dos contigs foi feita pelo programa CAP3 (Huang e Mandan 1999). O acesso ao pipeline de execução destes programas foi através de uma interface que pode ser acessada no endereço: <http://bioinformatica.cenargen.embrapa.br/phph>.

As sequências *consensus* obtidas foram comparadas com as sequências já depositadas no banco de dados do NCBI (NCBI, [http: www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) utilizando-se o programa BLASTn e BLASTx (Altschul et al. 1997). O programa ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) foi utilizado para identificação da fase de leitura e predição das proteínas. As sequências de nucleotídeos e aminoácidos foram alinhadas com sequências homólogas de proteínas *SERK* disponíveis no banco de dados do NCBI com maior identidade às de *E. grandiflorum* para análise dos domínios conservados.

Análise filogenética

O relacionamento filogenético da sequência de SERK de *E. grandiflorum* com as de outras espécies foi inferido mediante a construção de árvores filogenéticas. As sequências foram alinhadas com sequências de eudicotiledôneas e monocotiledôneas disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nih.nlm.gov>).

Alinhamentos múltiplos das sequências foram obtidos utilizando-se o programa MUSCLE (Edgar 2004) implementado no MEGA versão 5.0 (Tamura et al. 2011) disponível em <http://www.megasoftware.net/mega5>. Árvores filogenéticas foram obtidas utilizando o método de distância Neighbor-Joining (NJ) (Saitou e Nei 1987) com o modelo de substituição JTT (Jones et al. 1992) e distribuição Gamma. A confiabilidade de cada ramo da árvore foi estimada via teste Bootstrap (Felsenstein 1985) com 1.000 repetições.

Localização dos transcritos de *EgSERK* durante a embriogênese somática em *E. grandiflorum* por hibridização *in situ*

Coleta e preparo dos tecidos

Foram coletados calos embriogênicos com 0, 10, 20, 30, 40 d de indução e embriões somáticos com 30 d no meio de maturação. Os explantes foram coletados em condições livres da ação de RNAses e imersos imediatamente em solução de paraformaldeído 4 %, pH 7,0), sendo mantidos por 16 h nessa solução a 4 °C. Em seguida, procedeu-se a desidratação das amostras em série etílica (10 a 70 %). As amostras foram armazenadas a -20 °C até o momento de serem utilizadas, e posteriormente desidratadas em etanol 80, 90 e 100 % e infiltradas em parafina histológica (Histosec[®], Brasil).

Secções longitudinais de 4 µm foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço manual (Olympus america inc CUT 4055) e colocadas em lâminas Fisherbrand[®] (Fisher Scientific) livres de RNAses, secas a temperatura ambiente e armazenadas a 4 °C, até o uso. Antes da hibridização, a parafina foi removida com xilol 100 % (duas trocas de 5 min), solução contendo xilol e etanol (em uma relação 1:1, v/v) por 5 min etanol 100 % (duas trocas de 5 min).

Síntese das sondas sense e antisense marcadas com digoxigenina

Dois clones contendo as sequências parciais dos genes *EgSERK* foram selecionados conforme a orientação correta 5' - 3' dos insertos no vetor, e utilizados como molde para a

síntese das sondas. Foi utilizado como molde um fragmento de 878 bp, contendo uma região conservada que codifica parte da região rica em leucina e os domínios SPP, específico da família multigênica *SERK*, e o domínio transmembrana e parte do domínio quinase. Os insertos foram amplificados a partir de 10 ng do DNA plasmidial utilizando os iniciadores T7 e SP6, nas mesmas condições de amplificação já mencionadas anteriormente. Os produtos amplificados foram purificados com fenol/clorofórmio (1:1) e precipitados com acetato de sódio 3 M (1/10 v/v) e 2 volumes de etanol absoluto. Os produtos purificados foram analisados em gel de agarose 1 %, e quantificados por espectrofotometria com o auxílio do Nanodrop™ (Thermo Scientific) e com o fluorômetro Quantus (Promega).

As sondas de RNA (senso e anti-senso) foram sintetizadas por transcrição *in vitro*, utilizando o *DIG RNA Labeling kit (SP6/T7)* (Roche®) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração da sonda foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,2 % utilizando 100 e 200 ng do controle positivo de RNA marcado do mesmo *kit*, e a marcação confirmada por ‘dotblot’.

Reação de hibridização

Uma alíquota de 60 ng de tRNA de levedura (Invitrogen®) e 60 ng de sonda foram desnaturados a 80 °C por 5 min e adicionados a 100 µL do tampão de hibridização (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; NaCl 300 mM, formamida 50 %, EDTA 1 mM pH 8,0; solução de Denhardt 1X) e colocado nas lâminas, as quais foram incubadas em câmara úmida, a 42 °C, no escuro durante 16 h.

Reação de pós-hibridização e detecção imunológica

Após a hibridização, as lâminas foram lavadas em SSC 4X, 2X, 1X e 0,5X (solução SSC 20X = NaCl 3 M, Na₃-citrato 0,3 M, pH 7,2), cada solução por 20 min. Em seguida, foram mantidas por 5 min em tampão de detecção 1 (0,1 M de Tris-HCl pH 7,5; 0,15 M de NaCl) e incubadas por 30 min na solução bloqueadora 2 (tampão de detecção 1 acrescido de BSA 1 %). As secções foram novamente lavadas em tampão de detecção 1 por 5 min e incubadas durante 1 h com anticorpo Anti-Digoxigenina-AP, Fab Fragments (Roche®) diluído 1:1.000 em tampão de detecção 1. Após a sequência de duas lavagens, de 15 min cada, em tampão de detecção 1 e uma lavagem de 5 min em tampão de detecção 3 (0,1 M

de Tris-HCl pH 7,5; 0,1 M de NaCl; 0,05 M de $MgCl_2$, com pH final ajustado para 9,5) as secções foram incubadas em solução de coloração contendo 4,5 μL de BCIP (5-bromo- 4-cloro-3-indolil-fosfato) (Promega[®],USA) ($0,05\text{ g mL}^{-1}$) e 4,5 μL de NBT (nitrobluetetrazólio) (Promega[®],USA) ($0,05\text{ g mL}^{-1}$) em 1 mL de tampão 3 por aproximadamente 40 min, no escuro. Para cessar a reação, as secções foram incubadas no tampão de detecção 4 (0,01 M de Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA) por 10 min, e depois, lavadas duas vezes em água bidestilada.

A análise e captura das imagens foram realizadas em microscópio de luz e fluorescência (AX70TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japan) com câmera digital acoplada (modelo Olympus E-330). As secções submetidas ao vermelho neutro foram examinadas em luz UV com filtro de excitação azul (BP 450 - 490 nm).

RESULTADOS

Efeito da concentração do 2,4-D na indução de embriogênese somática

Foi estudado o potencial embriogênico de explantes radiculares de *Eustoma grandiflorum* em meio semissólido com concentrações crescentes de 2,4-D e ANA. No entanto, apenas os meios com 2,4-D apresentaram desenvolvimento de calos embriogênicos (Tabela 2).

Tabela 2. Observações realizadas após o cultivo de explantes radiculares de *lisianthus*, *Eustoma grandiflorum*, cultivados em meio MS sem regulador de crescimento (s/RC), com adição de ANA ou 2,4-D ao meio de cultura.

Meio de cultura	Calos embriogênicos	Resposta Morfogênica
MS		
s/RC	-	Sem resposta
ANA	-	Rizogênese
2,4-D	+	Embriogênese somática

Símbolos: (+) presença; (-) ausência

A frequência dos explantes induzidos à embriogênese somática ajustou-se a um modelo linear decrescente (Fig. 1a), no qual o maior valor observado foi de 97,5 % quando o material foi cultivado em meio MS acrescido de 10 μ M de 2,4-D. A taxa de oxidação ajustou-se a um modelo linear crescente, indicando que, na medida em que se aumenta a concentração do regulador de crescimento, a porcentagem de oxidação é diretamente proporcional (Fig. 1b).

Potencial de regeneração de embriões somáticos

O potencial de regeneração de calos embriogênicos foi comparado entre os 15 tratamentos, baseando-se na frequência de maturação, no número total de embriões formados/explante, na massa fresca e seca total de embriões, na porcentagem de biomassa fresca e seca de embriões. Para todas as variáveis, não houve desenvolvimento de embriões somáticos no meio MS s/RC.

Por outro lado, houve interação significativa entre o período de permanência do material no meio de indução de calos embriogênicos e o meio utilizado na fase de diferenciação e maturação dos embriões somáticos (Tabela 3).

Assim, com uso de 2 ou 4 μ M de BA na fase de maturação de embriões somáticos o tempo de permanência mais adequado na indução foi o de 40 d, obtendo-se 100 % de

frequência de maturação dos embriões somáticos para as duas concentrações de BA, sem apresentar diferença significativa quando comparado ao meio de maturação suplementado com 1,5 μM de GA_3 (87,5 %). No entanto, o meio MS com adição de GA_3 promoveu maior responsividade do explante quando o explante permaneceu em meio de indução de calos embriogênicos durante 50 d (alcançando 100 % de germinação tanto para 1,5 quanto para 3 μM de GA_3), os quais não diferiram estatisticamente do material cultivado em meio com adição de BA no mesmo tempo de permanência de 50 d. Por outro lado, a frequência de maturação foi menor estatisticamente quando o material permaneceu 60 d no meio de indução de calos embriogênicos para todos os tratamentos testados durante a fase de maturação (Tabela 3a).

Entre os períodos de permanência do material testados na fase de indução dos calos embriogênicos, houve maior número de embriões/explante foi em meio MS acrescido de 4 μM BA e 1,5 μM GA_3 (35 e 33,2; respectivamente), permanecendo nessas condições por 40 d. O tratamento que induziu menos embriões/explante foi o meio MS acrescido com 3 μM de GA_3 (3,9) por 40 d no meio de indução, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. Todavia, quando o material permaneceu por 50 d em meio de indução de calos embriogênicos, os meios de maturação com melhor resposta foram com 3 e 1,5 μM GA_3 (31,3 e 30,1 embriões/explante, respetivamente), sendo estatisticamente superior aos meios com acréscimo de BA (Tabela 3b).

Para as variáveis massa fresca e massa seca total dos embriões somáticos/explante, os maiores valores foram observados em meio MS suplementado com 2 ou 4 μM de BA por 40 d de cultivo. Por outro lado, quando o material permaneceu aos 50 e 60 d de cultivo em meio de indução de calos embriogênicos, não houve diferenças significativas entre si para nenhum dos tratamentos testados na fase de diferenciação e maturação dos embriões somáticos (Tabela 3c; 3e).

A porcentagem de biomassa fresca de embriões somáticos foi estatisticamente superior quando o material permaneceu por 40 d em meio de indução de calos embriogênicos, seguido de meio MS acrescido de 2 ou 4 μM de BA, na fase de diferenciação e maturação dos embriões somáticos, não diferindo estatisticamente quando os calos embriogênicos permaneceram no meio de indução por 50 d e maturado com as mesmas concentrações de 2 ou 4 μM BA. Porém, os embriões somáticos germinados com 3

μM de GA_3 apresentaram menor porcentagem de biomassa fresca de embriões (4,65 %), quando cultivados por 40 d em meio de indução. O material induzido durante 50 d não apresentou diferença significativa quando comparado ao material que permaneceu por 60 d. Também não foram observadas diferenças entre os meios estudados para nenhum dos dois tempos de permanência (Tabela 3d).

Para a porcentagem de biomassa seca de embriões, quando o material permaneceu por 40 d em meio de indução de calos embriogênicos, os meios suplementados com 2 e 4 μM de BA não apresentaram diferenças significativas entre si (42,4 e 55,8 %, respectivamente), sendo estatisticamente superiores aos meios com 1,5 e 3,0 μM GA_3 (19,5 % e 5,5 %, respectivamente) (Tabela 3f).

Tabela 3. Frequência de maturação (%) (a); Número de embriões (b); Massa fresca total dos embriões (mg) (c); Porcentagem de biomassa fresca de embriões (%) (d), Massa seca total dos embriões (mg) (e); e Porcentagem de biomassa seca de embriões (%) (f) em função dos dias de permanência em meio de indução de calos embriogênicos, do regulador de crescimento e da sua concentração utilizada, na formação de embriões somáticos em explantes radiculares de lisianthus (*Eustoma grandiflorum*).

(a)				(b)			
Tratamentos	40 d	50 d	60 d	Tratamentos	40 d	50 d	60 d
s/ RC	0 Ab	0 Ab	0 Aa	s/ RC	0 Ad	0 Ac	0 Ab
GA_3 – 1,5 μM	87,5 Aa	100 Aa	25 Ba	GA_3 – 1,5 μM	33,2 Aab	30,1 Aa	2,8 Bab
GA_3 – 3 μM	56,3 Ba	100 Aa	31,3 Ba	GA_3 – 3 μM	3,9 Bc	31,3 Aa	2,5 Bab
BA – 2 μM	100 Aa	93,8 Aa	31,3 Ba	BA – 2 μM	16,7 Ab	7,8 Ab	4,4 Ba
BA – 4 μM	100 Aa	68,8 Aa	31,3 Ba	BA – 4 μM	35 Aa	5,3 Bb	5,1 Ba

(c)				(d)			
Tratamentos	40 d	50 d	60 d	Tratamentos	40 d	50 d	60 d
s/ RC	0 Ab	0 Ab	0 Aa	s/ RC	0 Ac	0 Ab	0 Aa
GA_3 – 1,5 μM	99,6 Ab	59 Aab	70,4 Aa	GA_3 – 1,5 μM	16,2 Aab	17,4 Aa	19,6 Aa
GA_3 – 3 μM	23,4 Ab	74,4 Aab	38,8 Aa	GA_3 – 3 μM	4,7 Abc	19,9 Aa	16,4 Aa
BA – 2 μM	288 Aa	136 Ba	79,4 Ba	BA – 2 μM	37,8 Aa	25,1 ABa	13,1 Ba
BA – 4 μM	273 Aa	119 Ba	64 Ba	BA – 4 μM	37,6 Aa	18,8 ABa	8,8 Ba

(e)				(f)			
Tratamentos	40 d	50 d	60 d	Tratamentos	40 d	50 d	60 d
s/ RC	0 Ad	0 Ab	0 Aa	s/ RC	0 Ab	0 Ab	0 Aa
GA_3 – 1,5 μM	9 Abc	6,7 Aab	3,4 Aa	GA_3 – 1,5 μM	19,7 Ab	21,8 Aa	14,4 Aa
GA_3 – 3 μM	2,2 Acd	5,5 Aab	3 Aa	GA_3 – 3 μM	5,5 Ab	18,5 Aab	16,1 Aa
BA – 2 μM	20,8 Aa	7,4 Ba	4,1 Ba	BA – 2 μM	42,4 Aa	23,9 Ba	9,3 Ba
BA – 4 μM	15 Aab	5,7 Bab	4,6 Ba	BA – 4 μM	55,8 Aa	23,8 Ba	9,7 Ba

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Desenvolvimento dos embriões somáticos

No tempo zero, observou-se no explante radicular (anterior à inoculação no meio de indução de calos embriogênicos) a presença de cilindro vascular, periciclo constituído por uma única camada de células e a região do córtex (Fig. 2a).

Após 10 d de cultivo observou-se o início do processo de embriogênese somática *in vitro*, em meio MS acrescido de 10 μ M de 2,4-D, exibindo calogênese na superfície dos explantes radiculares (Fig. 2c). Foram observadas também divisões celulares no sentido anticlinal da região do periciclo (Fig. 2d). Nesta etapa as células em divisão apresentaram menor tamanho e formato isodiamétrico, apresentando citoplasma denso e núcleos volumosos. Notou-se acúmulo de compostos fenólicos, delimitando a região de proliferação embriogênica (Fig. 2d).

Durante todo o ciclo de cultivo constatou-se desenvolvimento dos calos embriogênicos na superfície dos explantes radiculares (Fig. 2e). Divisões periclinais e anticlinais na região do periciclo, assim como acúmulo de compostos fenólicos, foram evidenciadas aos 20 d de cultivo (Fig. 2f). Aos 30 d, observou-se aumento do tamanho de calos embriogênicos (Fig. 2g), desenvolvimento de estruturas colunares com calos (Fig. 2h) e desorganização das células associadas ao sistema vascular bem como intensas divisões celulares, as quais formaram zonas pró-embriogênicas com aumento na vacuolização celular (Fig. 2i).

Ao final do ciclo de indução de calos embriogênicos (40 d) notou-se rediferenciação das zonas pró-embriogênicas em embriões somáticos, apresentando assincronia de maturação (Fig. 2j; 2k). Os embriões apresentaram-se bem definidos, com estrutura bipolarizada, com protoderme evidente e sem ligação com o sistema vascular do tecido inicial (Fig. 3l).

Após 20 d da transferência dos explantes radiculares para o meio de maturação (MS suplementado com 2 μ M de BA), embriões somáticos em diferentes estádios foram visualizados na superfície do explante (Figs. 2m; 2n). Epiderme, meristema fundamental, procâmbio, primórdios foliares e domo apical foram identificados nas vitroplantas provenientes da etapa de maturação dos embriões somáticos, após 30 d de permanência em meio de maturação (Fig. 2o; 2p).

Caracterização histoquímica

Testes histoquímicos indicaram a presença de compostos de reserva como: grãos de amido, polissacarídeos, pectinas e proteínas; nas células parenquimáticas do córtex e em calos embriogênicos, porém, não houve reação positiva para lipídeos na fase de indução de embriogênese somática.

Observou-se mobilização das reservas nos tecidos radiculares ao longo do processo de embriogênese somática. Porém, não foi observado grãos de amido e proteínas nos embriões somáticos com 40 d no meio de indução, evidenciados pelas reações negativas ao lugol e XP. Por sua vez, na mesma época houve reação positiva com vermelho de rutênio e PAS, evidenciando a presença de pectinas e polissacarídeos, respectivamente. Após 30 d no meio de maturação com 2 μ M de BA os embriões somáticos germinados apresentaram reação positiva para lugol, PAS, vermelho de rutênio, vermelho neutro e XP, indicando a presença de grãos de amido, polissacarídeos, pectinas, lipídeos e proteínas totais, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Estudos histoquímicos da embriogênese somática de *Eustoma grandiflorum*, a partir de segmentos radiculares, submetidas ao lugol, PAS, vermelho de rutênio, XP e vermelho neutro.

Estádio de desenvolvimento	Lugol	PAS	Vermelho de rutênio	XP	Vermelho neutro
0 d indução	+	+	+	+	-
10 d indução	+	++	+++	++	-
20 d indução	+	+	++	+++	-
30 d indução	+++	+++	+	+++	-
40 d indução	-	+	+	-	-
30 d maturação	+	+	+	+	+

Abreviações: (-) reação negativa; (+) reação positiva; presença estrutural; (++) reação positiva; acúmulo da substância; e (+++) reação positiva intensa; intenso acúmulo da substância

No tempo zero, foi possível identificar a presença de grãos de amido e polissacarídeos no parênquima cortical dos explantes radiculares de *E. grandiflorum*, confirmados pela reação positiva aos testes de PAS (Fig. 3a). Assim também, houve intensificação do reagente vermelho de rutênio associado à pectina da parede celular (Fig. 3b). As proteínas totais foram evidenciadas pela reação positiva ao XP (Fig. 3c), sendo possível observar nas células do cilindro vascular, assim como no citoplasma restrito à região periférica das células diferenciadas do parênquima.

Após 10 d em meio de indução, parece haver um aumento leve no acúmulo de grãos de amido nas células corticais das raízes, houve também aumento da reação com PAS na região das células em divisão (Fig. 3d). Observou-se reação positiva a vermelho de rutênio (Fig. 3e) e XP (Fig. 3f) realçando elevada atividade de síntese de substâncias pécicas e proteínas. As proteínas totais sintetizadas delimitaram-se à região central das células em divisão.

Aos 20 d observou-se o mesmo padrão histoquímico evidenciado nos períodos anteriores. Houve reação positiva para PAS (Fig. 3g), vermelho de rutênio (Fig. 3h) e positiva para XP (Fig. 3i).

Com 30 d em meio de indução de calos embriogênicos, houve aumento aparente do acúmulo de grãos de amido nas zonas pró-embriogênicas, (Fig. 3j). Da mesma forma, apresentaram reação positiva para vermelho de rutênio (Fig. 3k) e positiva para XP evidenciando presença de pequenos corpos proteicos de reserva (Fig. 3l).

Clonagem e análise da provável sequência codificadora de genes *SERK* expressos durante a embriogênese em *Eustoma grandiflorum*

Análise das sequências de nucleotídeos

Para a clonagem das prováveis sequências foi utilizado RNA extraído a partir de explantes radiculares mantidos no meio de indução embriogênica durante 30 d. A combinação de iniciadores degenerados S1/S5 utilizada para a amplificação do cDNA de *SERK* de *E. grandiflorum*, gerou um fragmento de aproximadamente de 914 pb.

Após a análise das sequências de 12 clones foram gerados dois contigs. Na comparação das sequências de nucleotídeos dos contigs com aquelas depositadas no banco de dados do NCBI ambos os contigs apresentaram identidade com membros da família *SERK*. O contig 1, com 912 pb apresentou identidade de 81-82 % com *SERK1* e 77-80 % com *SERK2* (Tabela 5a). O contig 2, com 873 pb apresentou maior identidade, 77-82 %, com *SERK3/BAK1* de outras espécies. (Tabela 5b). Por outro lado, observou-se identidade de 75 % entre o contig 1 e o contig 2.

Tabela 5. Comparação da sequência nucleotídica do contig1 (a) e contig 2 (b), obtida da análise de clones de cDNA de *Eustoma grandiflorum* amplificado com os iniciadores degenerados S1/S5, com as sequências de outras espécies depositadas no banco de dados do NCBI.

(a)

Acesso	Descrição	Cobertura (%)	E-value	Identidade máxima (%)
NM_001288364.1	<i>Solanum tuberosum</i> (SERK1)	100	0,0	82
HM802242.1	<i>Rosa canina</i> (SERK1)	99	0,0	81
AY162176.1	<i>Medicago truncatula</i> (SERK1)	99	0,0	81
XM_002276378.3	<i>Vitis vinifera</i> (SERK2)	99	0,0	80
AF384969.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> (SERK2)	99	0,0	77

(b)

Acesso	Descrição	Cobertura (%)	E-value	Identidade máxima (%)
NM_001247697.1	<i>Solanum lycopersicum</i> (SERK3)	97	0,0	82
HQ332144.1	<i>Nicotiana benthamiana</i> (SERK3)	97	0,0	82
XM_0077042963.1	<i>Theobroma cacao</i> (BAK1)	97	0,0	81
XM_003547551.2	<i>Glycine max</i> (BAK1)	99	0,0	80
XM_010659320.1	<i>Vitis vinífera</i> (BAK1)	98	0,0	77

Análise da sequência de aminoácidos preditas

A análise das sequências nucleotídicas no programa ORF finder (NCBI) confirmou a presença de duas ORFs (*Open Reading frame*) para os contigs1 e 2. O contig 1 com 912 pb e 301 aminoácidos e o cotig1 com 873 pb e 290 aminoácidos.

Na comparação das sequências de aminoácidos dos contigs com as depositadas no banco de dados do NCBI, observou-se similaridade com membros da família de SERK. O contig 1 mostrou entre 97 – 98 % de similaridade com SERK1 de *Solanum tuberosum*, *Medicago truncatula* e *Rosa canina* e entre 92 - 97 % com SERK2 de *Zea mays*, *Vitis vinifera* e *Theobroma cacao*. Por outro lado, o contig 2 apresentou similaridade entre 92 – 94 % com SERK3/BAK1 de *Nicotiana benthamiana*, *Glycine max*, *Solanum lycopersicum*, *Theobroma cacao* e *Vitis vinifera*.

O múltiplo alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos dos contigs com as sequências que apresentam maior similaridade pelo BLASTp permitiu identificar domínios estruturais altamente conservados, característicos de proteínas SERK de outras espécies. Os dois contigs incluem parte do domínio extracelular contendo o padrão repetitivo de leucina (LRR1 até LRR5), a região rica em prolina, o domínio transmembrana e parte do domínio quinase. O restante das sequências, referente ao início das proteínas e à

extremidade C-terminal estão ausentes nos dois contigs analisados de *E. grandiflorum* devido a região de anelamento dos iniciadores degenerados.

O contig 2 de *E. grandiflorum* apresentou deleções de 11 aminoácidos representadas pelos gaps no alinhamento próxima a região rica em prolina (SPP), alinhados com AtSERK e AtBAK1. De forma contrária, no contig 1 foram observadas inserções de aminoácido nessa região, alinhados com AtSERK1 e AtSERK2. Em função da alta similaridade das sequências de aminoácidos das proteínas encontradas em *E. grandiflorum* com as demais encontradas no banco de dados, a partir daqui essas proteínas serão denominadas, de forma geral, *EgSERK*-like (Fig. 4).

Análise filogenética

Foi construída a árvore filogenética com base na sequência da proteína incluindo os motivos LRR ao domínio quinase, dos contigs de *E. grandiflorum* e seus homólogos SERK e BAK1 de outras espécies vegetais disponíveis no banco de dados, visando inferir a relação entre essas proteínas.

Na filogenia observou-se formação de três grupos bem sustentados pelo teste de *Bootstrap*. O grupo 1 formado por *SERK1* e *SERK2*, o grupo 2 constituído por *SERK3/BAK1*, e um terceiro grupo formado por *SERK4* e *SERK5*. A sequência do contig 1 ficou mais próximo aos membros de *SERK1* e *SERK2*, sustentado por um valor de *Bootstrap* de 99 %. O contig 2 agrupou-se aos membros de *SERK3/BAK1*, sustentado pelo valor de *Bootstrap* de 64 %. *AtSERK4*, por sua vez ficou mais próximo a *AtSERK5*, sustentado por um valor de *Bootstrap* de 100 % (Fig. 5).

Caracterização do padrão de expressão de *SERK* por hibridização *in situ*

Cortes longitudinais do segmento radicular em tempo zero de indução de *E. grandiflorum*, mostraram a presença de epiderme intacta, sistema vascular, periciclo e região do córtex (Fig. 6a), sendo que, a análise dos cortes histológicos hibridizados com sonda anti-senso não demonstrou sinal da expressão de *SERK* neste tempo (Fig. 6b). Aos 10 d no meio de indução com 2,4-D foram observadas divisões celulares anticlinais da região do periciclo (Fig. 6c). Nesse período, observou-se sinal de expressão de *SERK* fracamente marcado na região proliferativa (Fig. 6d).

Aos 20 d de cultivo houve intensificação das divisões periclinais e anticlinais na região do periciclo (Fig. 6e). E observou-se transcritos de SERK na região de proliferação celular, sendo mais intensamente marcada a região periférica (Fig. f). Aos 30 d observou-se formação de zonas pró-embriogênicas (Fig. 6g). Bem como, o sinal característico da expressão de SERK foi intensamente evidenciado nas zonas pró-embriogênicas (Fig. 6h).

Embriões somáticos em estágio globular foram observados aos 40 d no meio de indução (Fig. 6i). A hibridização *in situ* não mostrou nenhum sinal da expressão de *SERK* nessa fase (Fig. 6j). Após 30 d da transferência do material embriogênico ao meio de maturação com 2 μ M de BA, observou-se vitroplantas com primórdios foliares e domo apical bem formado (Fig. 6k). As vitroplantas proveniente da embriogênese somática de explantes radiculares de *E. grandiflorum* também não mostraram expressão de *SERK* quando hibridizadas com a sonda antisense (Fig. 6l). (Ouakfaoui et al. 2010)

DISCUSSÃO

Indução de culturas embriogênicas

O presente sistema de cultivo *in vitro* de *E. grandiflorum*, juntamente com o uso do regulador de crescimento 2,4-D, foi imprescindível para indução de calos embriogênicos em raízes, representando uma nova abordagem para a regeneração de plantas.

O uso do 2,4-D favorece a indução de embriogênese somática em explantes radiculares (Komai et al. 1996a; Twyford e Mantell 1996; Mikula e Rybczyński 2001; Iantcheva et al. 2005; Fiuk e Rybczyński 2007b; Yang et al. 2009), assim como, de distintos órgãos vegetais das espécies (Kuehnle et al. 1992; Sivanesan et al. 2011; Zhao et al. 2012; Pinheiro et al. 2014; Haque e Ghosh 2014) o que demonstra ser um regulador de crescimento eficiente neste processo. Assim também, o uso de 2,4-D foi proposto para induzir embriogênese somática em discos foliares de *E. grandiflorum* (Nhut et al. 2006) contudo, o uso de explantes radiculares ainda não foi relatado para esta espécie.

O 2,4-D parece atuar não só como análogo auxínico, mas também como fator de estresse, contribuindo dessa forma, na eficiência da indução embriogênica. Além disso, este regulador de crescimento tem o papel de aumentar o nível endógeno do ácido indolacético (AIA), bem como influenciar no metabolismo endógeno dos fito-hormônios (Jiménez e Thomas 2005). No entanto, se os níveis de estresse excedem a tolerância dos tecidos, as células podem sofrer necrose e danos irreversíveis, ocasionando a morte celular (Fehér et al. 2003; Zimmermann 2010; Fehér 2014). No presente trabalho, concentrações elevadas de 2,4-D foram prejudiciais na fase de indução embriogênica aumentando a taxa de oxidação e diminuindo a frequência de indução embriogênica (Fig. 1a, 1b).

Outro aspecto a ser considerado, durante a indução embriogênica, é o tempo de permanência do material em meio de cultura com adição de 2,4-D. Pois, um período prolongado de exposição contínua dos explantes a elevadas concentrações de auxinas pode levar à paralização do desenvolvimento embriogênico e perda do potencial de regeneração (Jiménez e Thomas 2005; Von Arnold 2008). Trabalhos com *Oryza sativa* (Gairi e Rashid 2004) e *Arabidopsis thaliana* (Von Arnold 2008) relatam que o tempo de duração em meio de cultura para indução de calos embriogênicos foi o fator decisivo no processo de embriogênese somática. O mesmo foi observado no presente trabalho, uma vez que a permanência dos explantes radiculares de *E. grandiflorum* durante 60 d em meio com 2, 4-

D, independentemente da concentração utilizada na fase de diferenciação e maturação dos embriões somáticos, ocasionou redução de todas as variáveis analisadas, demonstrando que a permanência durante tempos extensos em meio de indução é altamente prejudicial ao processo de embriogênese somática na espécie.

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho, recomenda-se o uso de 10 μ M de 2,4-D para o estabelecimento de calos embriogênicos de segmentos radiculares de *E. grandiflorum*, assim como manter o material o menor tempo possível na indução (40 d de cultivo).

Maturação dos embriões somáticos

Para a histodiferenciação e maturação dos embriões somáticos, foi necessário a retirada do 2,4-D do meio de indução e a adição de BA ou GA₃ ao meio de maturação, sendo que os dois reguladores geraram embriões somáticos em estágio cotiledonar. A adição de BA no meio de maturação para *E. grandiflorum* foi proposto por Nhut et al. (2006), contudo, o uso de GA₃ na fase de maturação ainda não foi proposto para a espécie em questão.

As giberelinas (GAs) são requeridas principalmente na fase final do desenvolvimento da embriogênese facilitando uma rápida germinação dos embriões somáticos (Komai et al. 1995; Choi et al. 1999; Yang e Choi 2000; Zlenko et al. 2002; Pareek and Kothari 2003; Sivanesan et al. 2011), assim como alongamento dos embriões somáticos em estádios mais avançados da maturação embriogênica (Twyford e Mantell 1996). Contudo, o uso de GA₃ na fase de maturação pode inibir a germinação de embriões somáticos (Naing et al. 2013). No presente trabalho, o uso de GA₃ promoveu germinação de embriões somáticos, porém, os embriões gerados apresentaram-se fracos, sendo demonstrado pelos valores baixos obtidos de massa fresca e seca em comparação aos valores observados com a adição de BA (Tabela 3c; 3e), bem como pela baixa porcentagem de biomassa fresca (máx. 19,9 %) e seca (máx. 21,8 %) de embriões germinados. Resultado semelhante foi relatado para *Medicago sativa*, onde houve diminuição da massa fresca dos calos embriogênicos à medida que aumentou a concentração de GA₃ (Ruduš et al. 2002).

Já o uso de citocininas ao meio de cultura desempenha um papel importante na divisão celular, assim como na diferenciação de calos embriogênicos (Danin et al. 1993

Jiménez e Thomas 2005), como foi observado com o uso de BA no meio de maturação em *Dioscorea alata* (Twyford e Mantell 1996) e *Corydalis yanhusuo* (Sagare et al. 2000).

Alguns trabalhos relatam o sucesso com a adição de GA₃ ou BA ao meio de cultivo para a maturação de embriões somáticos em espécies da família Gentianaceae (Mikuła e Rybczyński 2001; Fiuk e Rybczyński 2007a; Fiuk e Rybczyński 2008a). Estes reguladores de crescimento também têm sido utilizados para maturação de embriões somáticos provenientes de explantes radiculares (Komai et al. 1995; Twyford e Mantell 1996; Akashi et al. 1998; Yang et al. 2009). Esses autores relatam ainda que tanto o tipo de regulador de crescimento quanto à concentração utilizada são fatores determinantes na embriogênese somática.

Na maturação de embriões somáticos de *Arum palaestinum* observou-se que o uso de 8,8 µM de BA foi mais responsivo, gerando maior número de embriões por explante (Shibli et al. 2012). Porém, para *Curcuma amada* as concentrações acima de 1,33 µM de BA diminuíram a frequência de indução, assim como o número de embriões germinados por disco foliar (Soundar et al. 2012). Em *E. grandiflorum* a adição de 4,44 µM de BA na maturação embriogênica gerou maior número de vitroplantas/disco foliar, contudo o aumento da concentração (8,88 ou 13,32 µM de BA) levou a diminuição deste valor, até a inibição do processo de diferenciação e maturação dos embriões somáticos com o uso de 17,15 ou 22,19 µM de BA no meio de cultivo (Nhut et al. 2006). Por outro lado, o uso de GA₃ torna-se necessário para a regeneração de plântulas a partir de embriões somáticos provenientes de explantes radiculares de *Spinacia oleracea*, contudo, concentrações acima de 1 µM deste regulador de crescimento afetaram a frequência de formação das vitroplantas nessa espécie (Komai et al. 1996). Em *Campanula punctata* a adição de 2,88 µM de GA₃ no meio de cultivo aumentou significativamente a porcentagem de germinação de embriões somáticos provenientes de discos foliares (94 %; Sivanesan et al. 2011), assim como de discos foliares de *Dianthus* (75 %; Pareek e Kothari 2003). Esses resultados evidenciam que os teores de cada regulador de crescimento variam em função dos objetivos da cultura, da espécie e do tipo de explante cultivado (Xavier et al. 2009).

No presente experimento observou-se que o uso de 4 µM de BA no meio de maturação gerou maior número de embriões somáticos por explante radicular. Porém, o uso de 2 µM de BA gerou embriões somáticos com melhor vigor, evidenciado pelo maior

acúmulo de massa fresca e seca obtida, assim como pela porcentagem de biomassa fresca e seca de embriões somáticos/explante. Diante disso recomenda-se o uso de 2 μ M de BA no meio de maturação com permanência dos explantes radiculares por apenas 40 d no meio com 2,4-D.

Alterações anatômicas na embriogênese somática

A regeneração de plantas de *E. grandiflorum* via embriogênese somática a partir de explantes radiculares segue rotas morfológicas de desenvolvimento específicas que deram origem à formação de uma estrutura bipolar bem estruturada.

Os meios utilizados nas fases de indução de calos embriogênicos e diferenciação/maturação dos embriões somáticos promoveram embriogênese somática indireta e assincrônica como também foi observado em *Cichorium* (Dubois et al. 1990) e *Gentiana pannonica* (Mikuła e Rybczyński 2001), nos quais os autores relatam a formação de calos nos segmentos radiculares, sendo a primeira modificação visível do material no meio de indução de embriogênese somática. Por outro lado, a dediferenciação de células e sua rediferenciação em pequenos grupos de células individualizadas, zonas pró-embriogênicas, indicam que os embriões somáticos de *E. grandiflorum* tenham se originado via padrão multicelular, assim como descrito para outras espécies de plantas (Canhoto et al. 1996; Cangahuala-Inocente et al. 2004; Moura et al. 2008; Rocha et al. 2012b).

No presente estudo, após a indução dos explantes radiculares em meio contendo 2,4-D, foram observadas divisões celulares em diferentes planos das células do periciclo, as quais deram origem aos embriões somáticos, como observado em explantes radiculares de *Brassica oleracea* (Yang et al. 2009). Similarmente, o uso de AIA e ANA promoveram estas divisões celulares em explantes radiculares de explantes radiculares (Laskowski e Williams 1995; Benková et al. 2003), corroborando a função das auxinas como regulador de crescimento fundamental para indução da embriogênese somática nas espécies. As células em divisão assemelharam-se às células meristemáticas, com citoplasma denso e núcleos volumosos, características típicas de células com competência embriogênica (Williams e Maheswaran 1986; Carman 1990; Merkle et al. 1995; Jiménez 2001, Elmeer 2013).

Adicionalmente, na fase de diferenciação e maturação foi observado desenvolvimento de cotilédones, meristema apical, sistema vascular e meristema radicular,

demonstrando a similaridade morfológica com embriões zigóticos. Observações similares ocorreram em explantes radiculares de *Eleutherococcus koreanum* (Park et al. 2005) e de *Chrysanthemum* (Xu et al. 2012). Os embriões somáticos germinados no presente estudo, não apresentaram conexão vascular com o explante inicial, característica determinante que diferencia entre as duas vias morfogênicas *in vitro*: embriogênese somática e organogênese como descrito para *Passiflora edulis* (Rocha et al. 2014).

Ressalta-se ainda, que análises estruturais indicaram a presença de divisões celulares concêntricas, chamadas de meristemoides, nas vitroplantas. Esta resposta pode estar relacionada à adição de 4 μ M BA no meio de maturação dos embriões (dados não mostrados), dessa forma, sugere-se a necessidade de redução para 2 μ M da concentração de BA na fase de maturação em *E. grandiflorum*.

Análises histoquímicas e mobilização de reservas

Durante o desenvolvimento dos embriões somáticos em *E. grandiflorum* foi notada a presença de compostos fenólicos nos tecidos dos explantes radiculares. Em cultivo *in vitro* a síntese de compostos fenólicos está relacionada com a desdiferenciação celular e em resposta à injúria e ao estresse induzidos pelas condições do cultivo (Alemanno et al. 2003). Estes compostos estão associados com a atividade antioxidante devido à capacidade de remoção ou mesmo eliminação de radicais livres (Alemanno et al. 2003; Sá et al. 2012). Reis et al. (2008) através de estudos histológicos e de ultraestrutura demonstraram que embriões somáticos de *Feijoa sellowiana*, formaram-se em estreita associação com compostos fenólicos, sugerindo que estes compostos são essenciais para o controle de alguns processos morfogênicos que ocorrem *in vitro*.

Características histoquímicas observadas inicialmente nas células da raiz de *E. grandiflorum*, como baixo acúmulo de amido e proteínas, podem ser interpretadas como sinais de baixa atividade metabólica, o que também foi observado em explantes radiculares de *Gentiana cruciata* (Mikuła et al. 2002), espécie da mesma família. Porém, o acúmulo de nutrientes necessários para o desenvolvimento e germinação dos embriões somáticos de *E. grandiflorum* assemelhou-se ao comportamento de embriões zigóticos. No entanto, como ocorre em outros processos embriogênicos, o tempo de acúmulo e a proporção dos nutrientes pode variar de espécie para espécie (Yeung e Meinke 1993; Merkle et al. 1995).

No presente trabalho não foi observado deposição de lipídeos ao longo do processo de indução de calos embriogênicos, porém os embriões somáticos germinados apresentaram reação positiva na epiderme dos primórdios foliares, para vermelho neutro, denotando deposição de ceras e cutina na parede das células epidérmicas. As ceras e cutina são compostos de lipídeos que cobrem os tecidos externos de muitos órgãos vegetais (ex. folhas e frutos - Alquini et al. 2012). Distinta resposta, para outras espécies nas quais observou-se acúmulo e mobilização de corpos lipídicos ao longo do desenvolvimento dos embriões somáticos (Iantcheva et al. 2005; Fiuk e Rybczyński 2008b; Rocha et al. 2012b).

Entre os polissacarídeos constituintes da membrana celular há a celulose, hemicelulose e substâncias pécticas (Evert 2006; Scatena e Scremin-Dias 2012). Assim, nas células parenquimáticas do córtex de explantes radiculares de *E. grandiflorum* foram identificados polissacarídeos estruturais pela reação positiva do PAS e vermelho neutro, com alterações aparentes dos constituintes da membrana celular nas células em divisão até o desenvolvimento das zonas pró-embriogênicas. As propriedades estruturais e bioquímicas da membrana celular mudam ao longo do crescimento e desenvolvimento celular, participando diretamente do desenvolvimento e diferenciação celular durante o processo de embriogênese somática (Malinowski e Filipecki 2002). Em *Feijoa sellowiana* (Canhoto et al. 1996), *Gentiana creciata* (Mikula et al. 2002) e *Gentiana punctata* (Mikula et al. 2004), foi observado espessamento da membrana celular no início da indução embriogênica semelhante ao observado no presente trabalho. As células somáticas que adquirem competência embriogênica são frequentemente isoladas física e fisiologicamente das células adjacente pelo espessamento da parede celular, assim como pela ausência ou redução do número de plasmodesmas (Verdeil et al., 2007).

Por outro lado, houve aumento aparente da concentração de substâncias pécticas no início das divisões celulares até o desenvolvimento das zonas pró-embriogênica. O mesmo resultado foi observado em *Musa* spp., no qual houve secreção de pectinas na superfície das células embriogênicas e não embriogênicas, bem como nos embriões somáticos (Xu et al. 2011).

No presente trabalho, foi possível identificar o aumento significativo dos níveis de proteínas citoplasmáticas e nucleares durante a formação de células embriogênicas, porém houve diminuição deste composto durante a germinação. Comportamento semelhante foi

observado na indução embriogênica em explantes cotiledonares de *Camellia japonica* L. (Barciela e Vieitez 1993). Além disso, Sané et al. (2006) demonstraram que o acúmulo de grãos de amido e de proteínas foi reduzindo nas fases mais tardias da embriogênese somática de *Phoenix dactylifera*, o mesmo observado no presente trabalho.

Durante todo o processo de embriogênese somática de explantes radiculares de *E. grandiflorum* ocorreu síntese de amido e mobilização. O mesmo comportamento foi observado na indução de embriogênese somática para diferentes explantes de *Gentiana* spp. (Mikula et al. 1996; Mikula et al. 2002). O amido tem a capacidade de fornecer energia para as células em divisão e posterior formação de calos embriogênicos (Barciela e Vieitez 1993). A presença de amiloplastos com grãos de amido indicam a aquisição de competência à embriogênese somática (Mikula et al. 1996; Fiuk e Rybczyński 2008b).

Comparação entre *EgSERK-like* e *SERK* de outras espécies

Neste trabalho foram isolados duas sequencias parciais relacionadas com membros da família *SERK*. Tais sequências foram amplificadas a partir do cDNA de calos embriogênicos com 30 d de cultivo em meio de indução com 2,4-D. A comparação das sequências nucleotídicas e de aminoácidos deduzidos dos contigs 1 e 2 de *EgSER-like* com banco de dados demonstrou alta similaridade com *SERK1*, *SERK2*, *SERK3/BAK1*, de outras espécies, especialmente de eudicotiledôneas como *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana* e *Theobroma cacao*, entre outras. Relatos na literatura demostram que homólogos de *SERKs* estão associados com o potencial embriogênico das culturas, tanto nas espécies monocotiledôneas, quanto nas eudicotiledôneas. (Schmidt et al. 1997; Hecht et al. 2001; Thomas et al. 2004; Sharma et al. 2005; Sharma et al. 2008; Pérez-Núñez et al. 2009; Nolan et al. 2009). Diante disso, acredita-se que o *EgSERK-like* desempenha um papel conservado na embriogênese somática de segmentos radiculares de *E. grandiflorum*.

O alinhamento das sequências de aminoácidos deduzidas dos contigs *EgSERK-like* com homólogos de outras espécies mostrou a presença de parte dos domínios ricos em leucina, os domínios transmembrana e quinase característicos de proteínas *SERK*. O contig1 apresentou maior similaridade com *SERK1* e *SERK2*. O contig 2, por sua vez apresentou maior similaridade com homólogos de *SERK3*. Esse resultado, possivelmente esteja relacionado com a ocorrência da deleção de 11 aminoácidos próximo ao domínio SPP no contig 2, característica que se repete nas proteínas *SERK3* de *Arabidopsis thaliana*

(Hecht et al. 2001), *Vitis vinifera* (Schellenbaum et al. 2008), *Solanum lycopersicum* (Sakamoto et al. 2012).

A análise filogenética separou os contigs 1 e 2 em dois grupos distintos. O contig 1 agrupou-se principalmente com sequências de proteínas descritas como SERK1 e SERK2 relacionados com embriogênese somática de espécies como *Daucus carota* (Schmidt et al. 1997), *Arabidopsis thaliana* (Hecht et al. 2001), *Medicago truncatula* (Nolan et al. 2003), *Theobroma cacao* (Santos et al. 2005), *Solanum tuberosum* (Sharma et al. 2008), *Vitis vinifera* (Schellenbaum et al. 2008), *Rosa canina* (Kedong et al. 2011) e *Glycine max* (Yang et al. 2011). O gene *SERK* é expresso durante a aquisição de competência embriogênica das células somáticas, bem como ao longo do desenvolvimento dos embriões somáticos e zigóticos (Schmidt et al. 1997; Hecht et al. 2001; Radoeva e Weijers 2014).

O contig 2 posicionou-se no grupo de homólogos de SERK3/BAK1 das espécies *A. thaliana* (Chinchilla et al. 2007; Heese et al. 2007), *Vitis vinifera* (Schellenbaum et al. 2008), *Solanum lycopersicum* (Fradin et al. 2009), *Nicotiana bethamiana* (Chaparro-Garcia et al. 2011) e *Theobroma cacao* (Motamayor et al. 2013). O gene *SERK3*, nomeado também como BRI1- Associated Receptor Kinase1 (*BAK1*) está associado com a sinalização mediada por brassinosteroides (Li et al. 2002; Nam e Li 2002), sugerindo dessa forma que a sinalização tanto de *SERKs* quanto de brassinosteroides está interligada entre si (Karlova et al. 2006). O gene *BAK1* foi relacionado com morte celular programada e resistência às doenças e aos patógenos (He et al. 2000; Chinchilla et al. 2007; Heese et al. 2007; Kemmerling et al. 2007; Wu e Zhou 2013). Além disso, pesquisas descreveram a expressão de *SERK3* na embriogênese somática de *Triticum aestivum* (Singla et al. 2008), *Vitis vinifera* (Schellenbaum et al. 2008), *Rosa hybrida* (Zakizadeh et al. 2010), *Zea mays* (Zhang et al. 2011) e *Ananas comosus* (Ma et al. 2014). Os resultados deste trabalho sugerem que o *SERK3/BAK1* também pode atuar na resposta embriogênica em *E. grandiflorum* e que possivelmente esteja associado a sinalização de brassinosteroides nesse processo. Smertenko and Bozhkov (2014), propuseram que a família multigênica *SERK* modula a sinalização de brassinosteroides na embriogênese.

Diante das divergências observadas nas análises de blast, de alinhamento e de filogenéticas para o *EgSERK-like* sugere-se que pode-se tratar de distintos membros da família *SERK*. Assim, o contig 1 e 2 são possíveis homólogos de *SERK1* e *SERK3*,

respectivamente, os quais provavelmente estão associados com indução de embriogênese somática em segmentos radiculares de *E. grandiflorum*.

Expressão de genes *SERK* durante a embriogênese somática

Através da hibridização *in situ*, foi possível notar a presença dos transcritos de *SERK* nas diversas fases do desenvolvimento da embriogênese somática de segmentos radiculares de *E. grandiflorum*. Foi utilizada uma sonda sintetizada numa região conservada, portanto não sendo possível distinguir os diferentes membros da família *SERK*. O sinal foi detectado com o início das divisões celulares na região do periciclo, houve aumento de forma gradativa do sinal de expressão de *SERK*, sendo mais intensamente marcado nos pró-embriões, decrescendo ao longo da indução embriogênica até o completo desaparecimento no estágio globular.

Os reguladores de crescimento, assim como condições de estresse, são considerados os fatores principais envolvidos na tradução de sinais que levam a reprogramação da expressão gênica de células somáticas, dando origem as divisões celulares assimétricas e desencadeando o desenvolvimento embriogênico (Zavattieri et al. 2010). Entre os genes envolvidos na aquisição de competência embriogênica o mais estudado é o *SERK*, sendo descritos em grande número de angiospermas (Somleva et al. 2000; Hecht et al. 2001; Baudino et al. 2001; Ito et al. 2005; Sharma et al. 2008; Singla et al. 2008; Nolan et al. 2009; Kedong et al. 2011; Wang et al. 2011; Ma et al. 2012; Savona et al. 2012; Ben Mahmoud et al. 2013; Rekik et al. 2013; Huang et al. 2014; Ma et al. 2014; Silva et al. 2014; Talapatra et al. 2014; Podio et al. 2014; Li et al. 2014). Por sua vez, o gene *SERK* pode ser regulado pelas auxinas em algumas espécies, e pelas auxinas e citocininas em outras (Zhang et al. 2011). No presente trabalho acredita-se que o 2,4-D esteja regulando a expressão de *EgSERK-like*, atuando como molécula sinalizadora na indução embriogênica de explantes radiculares de *E. grandiflorum*. Assim também, vários trabalhos evidenciaram a capacidade que o 2,4-D apresenta na indução da expressão gênica nas espécies (Fehér 2014).

A expressão do *SERK* vem sendo utilizada como uma ferramenta para monitorar a embriogênese durante o cultivo *in vitro* em várias espécies (Schmidt et al. 1997; Albrecht et al. 2005; Steiner et al. 2012). Trabalhos mostram sinal da expressão de *SERK* em células com competência embriogênica (Rocha e Dornelas 2013), células meristemáticas (Savona

et al. 2012; Li et al. 2014), do sistema vascular e células do córtex do sistema radicular (Kwaaitaal e De Vries 2007; Nolan et al. 2009). No presente trabalho, foram sinalizadas as regiões proliferativas com competência embriogênica, no entanto as células meristemáticas (ápice) e do sistema radicular no tempo zero não apresentaram sinal da expressão de *SERK* após a hibridização *in situ*. Corroborando, dessa forma, com a hipótese que os *SERKs* em *E. grandiflorum* podem estar diretamente relacionados com a aquisição da competência embriogênica das células durante a embriogênese somática, em segmentos radiculares nesta espécie.

Por outro lado, membros da família *SERK* também desempenham outras funções no amplo desenvolvimento das plantas, assim a expressão dos homólogos de *SERK* ocorre em outros tecidos vegetais (Baudino et al. 2001; Ito et al. 2005; Zakizadeh et al. 2010; Du et al. 2012; Ma et al. 2012; Ma et al. 2014), bem como na sinalização de células pluripotentes (Savona et al. 2012) e outros processos morfogênicos *in vitro* (Thomas et al. 2004; Nolan et al. 2009; Wang et al. 2011; Savona et al. 2012). Assim, novas pesquisas são necessárias com o intuito de localizar a presença de transcritos de *SERK* nos diferentes tecidos vegetais de *E. grandiflorum*.

Comparando os resultados do padrão de expressão de *SERK* observados no presente trabalho observou-se o mesmo descrito para *Momordica charantia* (Talapatra et al. 2014), no qual a expressão de *SERK* é limitada aos estádios iniciais da embriogênese somática, sugerindo que a aquisição de competência embriogênica pelas células somáticas constitui o papel principal de atuação do *EgSERK-like* na indução embriogênica de *E. grandiflorum*. De forma contrária, a expressão característica de *SERK* na embriogênese somática de *Dactylis glomerata* (Somleva et al. 2000), *A thaliana* (Salaj et al. 2008) e *Zea Mays* (Zhang et al. 2011) estendeu-se até o estágio globular e a fase de maturação dos embriões somáticos. Assim, de acordo com as condições fisiológicas submetidas, o gene *SERK* pode ser expresso de maneira diferenciada na embriogênese somática em espécies de eudicotiledôneas, monocotiledôneas e gimnospermas (Steiner et al. 2012).

Os resultados obtidos no presente trabalho fornecem um protocolo eficiente de embriogênese somática a partir de explantes radiculares de *E. grandiflorum*, com informações detalhadas das mudanças anatômicas e histoquímicas, assim como caracterização da expressão dos genes *SERK* durante todo o processo. Ampliando dessa

forma, o conhecimento da morfogênese *in vitro*, bem como da embriogênese somática em raiz nessa espécie, que até o momento não havia sido descrita. Os dados podem auxiliar em futuras pesquisas para transformação genética, bem como, para identificação de outros genes marcadores da embriogênese somática, assim como dos fatores envolvidos na transição embriogênica.

REFERÊNCIAS

- Akashi R, Hoffmann-Tsay S-S, Hoffmann F (1998) Selection of a super-growing legume root culture that permits controlled switching between root cloning and direct embryogenesis. *Theor Appl Genet* 96:758–764. doi: 10.1007/s001220050799
- Albrecht C, Russinova E, Hecht V, Baaijens E, de Vries S (2005) The *Arabidopsis thaliana* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASES1 and 2 control male sporogenesis. *Plant Cell* 17:3337–3349. doi: 10.1105/tpc.105.036814
- Alemanno L, Ramos T, Gargadenec A, Andary C, Ferriere N (2003) Localization and identification of phenolic compounds in *Theobroma cacao* L. somatic embryogenesis. *Ann Bot* 92:613–23. doi: 10.1093/aob/mcg177
- Alquini Y, Bona C, Boeger T. MR, da Costa GC, Barros FC (2012) Epiderme. In: Appezatto da Gloria B, Carmello-Guerreiro SM (orgs) *Anatomia Vegetal*, 3º edn. Editora UFV, Viçosa, MG, p 85–104
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res* 25:3389–3402.
- Arnhold E (2014) Easynova: Analysis of variance and other important complementary analyzes. R package version 4.0.
- Awad V, Shirke R, Mukherjee S, Khadke S, Pawar P, Meti N, Harsulkar A (2011) Somatic embryogenesis, regeneration and *in vitro* production of glycyrrhizic acid from root cultures of *Taverniera cuneifolia* (Roth) Arn. In *Vitro Cell Dev Biol - Plant* 47:525–535. doi: 10.1007/s11627-011-9356-5
- Barciela J, Vieitez A (1993) Anatomical sequence and morphometric analysis during somatic embryogenesis on cultured cotyledon explants of *Camellia japonica* L. *Ann Bot* 71:395–404. doi: 10.1006/anbo.1993.1050
- Baudino S, Hansen S, Brettschneider R, Hecht VFG, Dresselhaus T, Lörz H, Dumas C, Rogowsky PM (2001) Molecular characterisation of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the *SERK* gene family. *Planta* 213:1–10. doi: 10.1007/s004250000471
- Ben Mahmoud K, Delporte F, Muhovski Y, Elloumi N, Jemmali A, Druart P (2013) Expression of *PiABP19*, *Picdc2* and *PiSERK3* during induction of somatic embryogenesis in leaflets of *Prunus incisa* (Thunb.). *Mol Biol Rep* 40:1569–1577. doi: 10.1007/s11033-012-2205-8

- Benková E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertová D, Jürgens G, Friml J (2003) Local, efflux-Dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115:591–602. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00924-3
- Bozzola JJ, Russell LD (1992) *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists*. Jones and Barlett, Boston
- Branca C, Torelli A, Fermi P, Altamura, MM, Bassi M (1994) Early phases *in vitro* culture of tomato cotyledons: Starch accumulation and protein pattern in relation to the hormonal treatment. *Protoplasma* 182:59–64. doi: 10.1007/BF01403689
- Cairney J, Zheng L, Cowels A, Hsiao J, Zismann V, Liu J, Ouyang S, Thibaud-Nissen F, Hamilton J, Childs K, Pullman GS, Zhang Y, Oh T, Buell CR (2006) Expressed Sequence Tags from loblolly pine embryos reveal similarities with angiosperm embryogenesis. *Plant Mol Biol* 62:485–501. doi: 10.1007/s11103-006-9035-9
- Cangahuala-Inocente GC, Steiner N, Maldonado SB, Guerra MP (2009) Patterns of protein and carbohydrate accumulation during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana*. *Pesq Agropec Bras* 44:217–224. doi: 10.1590/S0100-204X2009000300001
- Cangahuala-Inocente GC, Steiner N, Santos M, Guerra MP (2004) Morphological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. *Protoplasma* 224:33–44. doi: 10.1007/s00709-004-0055-5
- Canhoto J, Mesquita JF, Cruz GS (1996) Ultrastructural changes in cotyledons of pineapple guava (*Myrtaceae*) during somatic embryogenesis. *Ann Bot* 78:513–521. doi: 10.1006/anbo.1996.0149
- Carman JG (1990) Embryogenic cells in plant tissue cultures: Occurrence and behavior. In *Vitro Cell Dev Biol* 26:746–753. doi: 10.1007/BF02623615
- Chaparro-Garcia A, Wilkinson RC, Gimenez-Ibanez S, Findlay K, Coffey MD, Zipfel C, Rathjen JP, Kamoun S, Schornack S (2011) The receptor-like kinase *serk3/bak1* is required for basal resistance against the late blight pathogen *Phytophthora infestans* in *Nicotiana benthamiana*. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0016608
- Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nürnberger T, Jones JDG, Felix G, Boller T (2007) A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* 448:497–500. doi: 10.1038/nature05999
- Choi Y-E, Yang D-C, Yoon E-S, Choi K-T (1999) High-efficiency plant production via direct somatic single embryogenesis from preplasmolysed cotyledons of *Panax ginseng* and possible dormancy of somatic embryos. *Plant Cell Rep* 18:493–499. doi: 10.1007/s002990050610

- Cock JM, Vanoosthuyse V, Gaude T (2002) Receptor kinase signalling in plants and animals: Distinct molecular systems with mechanistic similarities. *Curr Opin Cell Biol* 14:230–236. doi: 10.1016/S0955-0674(02)00305-8
- Danin M, Upfold SJ, Levin N, Nadel BL, Altman A, van Staden J (1993) Polyamines and cytokinins in celery embryogenic cell cultures. *Plant Growth Regul* 12:245–254. doi: 10.1007/BF00027205
- Dole JM, Wilkins HF (2005) *Eustoma*. Floric. in: *Floriculture: Principles and Species*. Pearson Prentice Hall, New Jersey, p. 514–521.
- Du J, Yin H, Zhang S, Wei Z, Zhao B, Zhang J, Gou X, Lin H, Li J (2012) Somatic embryogenesis receptor kinases control root development mainly via brassinosteroid-independent actions in *Arabidopsis thaliana*. *J Integr Plant Biol* 54:388–99. doi: 10.1111/j.1744-7909.2012.01124.x
- Dubois T, Guedira MJ, Dubois, Vasseur J (1990) Direct somatic embryogenesis in roots of *Cichorium*: Is callose an early marker? *Ann Bot* 65:539–545.
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32:1792–7. doi: 10.1093/nar/gkh340
- Ouakfaoui ES, Schnell J, Abdeen A, Colville A, Labbé H, Han S, Baum B, Laberge S, Miki B (2010) Control of somatic embryogenesis and embryo development by AP2 transcription factors. *Plant Mol Biol* 74:313–26. doi: 10.1007/s11103-010-9674-8
- Elmeer SE (2013) Factors Regulating Somatic Embryogenesis in Plants. In: Aslam J, Srivastava PS, Sharma MP (orgs) *Somatic embriogenesis and gene expression*. Narosa, India, p. 56–81.
- Evert RF (2006) Cell Wall. In: Evert RF (org) *Esau's Plant Anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and devolpment*. John Wiley & Sons, Madison, p. 65–102.
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P (1998) Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using *Phred*. Accuracy Assessment. *Genome Res* 8:175–185. doi: 10.1101/gr.8.3.175
- Feder N, O'Brien T (1968) Plant microtechnique: some principles and new methods. *Am J Bot* 55:123–142.
- Fehér A (2005) Why somatic plant cells start to form embryos? *Plant Cell Monogr* 2:85–101. doi: 10.1007/7089_019
- Fehér A (2008) The initiation phase of somatic embryogenesis: What we know and what we don't. *Acta Biol Szeged* 52:53–56.

- Fehér A (2014) Somatic embryogenesis - Stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech* 1–18. doi: 10.1016/j.bbagrm.2014.07.005
- Fehér A, Pasternak TP, Dudits D (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 74:201–228. doi: 10.1023/A:1024033216561
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* (N Y) 39:783–791. doi: 10.2307/2408678
- Ferreira EB, Cavalcanti PP, Nogueira DA (2013) ExpDes: Experimental Designs package versão 1.1.2.
- Fiuk A, Rybczyński JJ (2007a) Morphogenic capability of *Gentiana kurroo* Royle seedling and leaf explants. *Acta Physiol Plant* 30:157–166. doi: 10.1007/s11738-007-0104-8
- Fiuk A, Rybczyński JJ (2007b) The effect of several factors on somatic embryogenesis and plant regeneration in protoplast cultures of *Gentiana kurroo* (Royle). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 91:263–271. doi: 10.1007/s11240-007-9293-5
- Fiuk A, Rybczyński JJ (2008a) Genotype and plant growth regulator-dependent response of somatic embryogenesis from *Gentiana* spp. leaf explants. *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* 44:90–99. doi: 10.1007/s11627-008-9124-3
- Fiuk A, Rybczyński JJ (2008b) Factors influencing efficiency of somatic embryogenesis of *Gentiana kurroo* (Royle) cell suspension. *Plant Biotechnol Rep* 2:33–39. doi: 10.1007/s11816-008-0045-8
- Fradin EF, Zhang Z, Juarez Ayala JC, Castroverde CDM, Nazar RN, Robb J, Liu CM, Thomma BPHJ (2009) Genetic dissection of *Verticillium* wilt resistance mediated by tomato Ve1. *Plant Physiol* 150:320–332. doi: 10.1104/pp.109.136762
- Gairi A, Rashid A (2004) TDZ-induced somatic embryogenesis in non-responsive caryopses of rice using a short treatment with 2,4-D. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 76:29–33. doi: 10.1023/A:1025864605846
- Gaj MD (2004) Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regul* 43:27–47. doi: 10.1023/B:GROW.0000038275.29262.fb
- Griesbach RJ, Semeniuk P, Roh M, Lawson RH (1988) Tissue culture in improvement of *Eustoma*. *HortScience* 23:791.
- Haque SM, Ghosh B (2014) Somatic embryogenesis and synthetic seed production--a biotechnological approach for true-to-type propagation and *in vitro* conservation of an

- ornamental bulbaceous plant *Drimiopsis kirkii* Baker. Appl Biochem Biotechnol 172:4013–24. doi: 10.1007/s12010-014-0817-2
- Harbaugh BK (2007) *Lisianthus Eustoma grandiflorum*. In: Neil O. A (org) Flower breeding and genetics issues, challenges and opportunities for the 21st century, 1^o edn. Springer, Netherlands, p 645–663
- Harbaugh BK, Scott JW (2003) “Maurine Twilight” and “Maurine Daylight” – heat-tolerant lisianthus with bi-colored flowers. HortScience 31:131–132.
- He Z, Wang ZY, Li J, Zhu Q, Lamb C, Ronald P, Chory J (2000) Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BRI1. Science 288:2360–2363. doi: 10.1126/science.288.5475.2360
- Hecht V, Vielle-Calzada JP, Hartog MV, Schmidt EDL, Boutilier K, Grossniklaus U, De Vries SC (2001) The Arabidopsis *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1* gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic Competence in culture. Plant Physiol 127:803–816. doi: 10.1104/pp.010324
- Heese A, Hann DR, Gimenez-Ibanez S, Jones AME, He K, Li J, Schroeder JI, Peck SC, Rathjen JP (2007) The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. Proc Natl Acad Sci U S A 104:12217–12222. doi: 10.1073/pnas.0705306104
- Huang X, Mandan A (1999) CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. Genome Res 9:868–877. doi: 10.1101/gr.9.9.868
- Huang YW, Tsai YJ, Chen FC (2014) Characterization and expression analysis of somatic embryogenesis receptor-like kinase genes from *Phalaenopsis*. Genet Mol Res 13:10690–10703.
- Iantcheva A, Slavov S, Prinsen E, Vlahova M, van Iantcheva H, Onckelen HV, Atanassov A (2005) Embryo induction and regeneration from root explants of *Medicago truncatula* after osmotic pre-treatment. Plant Cell Tiss Organ Cult 81:37–43. doi: 10.1007/s11240-004-2774-x
- Ito Y, Takaya K, Kurata N (2005) Expression of *SERK* family receptor-like protein kinase genes in rice. Biochim Biophys Acta 1730:253–258. doi: 10.1016/j.bbaexp.2005.06.007
- Jiménez V.M., Thomas C. (2005) Participation of plant hormones in determination and progression of somatic embryogenesis. Plant Cell Monogr. 2, 103–118. doi:10.1007/7089_034

- Jiménez VM (2001) Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. *Rev Bras Fisiol Veg* 13:196–223. doi: 10.1590/S0103-31312001000200008
- Jiménez VM (2005) Involvement of Plant Hormones and Plant Growth Regulators on *in vitro* Somatic Embryogenesis. *Plant Growth Regul* 47:91–110. doi: 10.1007/s10725-005-3478-x
- Johansen DA (1940) *Plant Microtechnique*, 1^o ed. McGraw-Hill Book Company, Inc, New York and London.
- Jones DT, Taylor WR, Thornton JM (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Bioinformatics* 8:275–282. doi: 10.1093/bioinformatics/8.3.275
- Karlova R, Boeren S, Russinova E, Aker J, Vervoort J, Vries S (2006) The *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1 protein complex includes BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1. *Plant Cell* 18:626–638. doi: 10.1105/tpc.105.039412
- Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27:137–138.
- Kaviani B (2014) Micropropagation of ten weeks (*Matthiola incana*) and lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) (two ornamental plants) by using kinetin (kin), naphthalene acetic acid (NAA) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Acta Sci Pol Cultus* 13:141–154.
- Kedong X, Qinglin L, Huifang Y, Li Z, Lili D, Fengluan L, Ling B (2011) Isolation and molecular characterization of *RcSERK1*: A *Rosa canina* gene transcriptionally induced during initiation of protocorm-like bodies. *J Biotechnol* 10:4011–4017. doi: 10.5897/AJB10.1520
- Kemmerling B, Schwedt A, Rodriguez P, Mazzotta S, Frank M, Qamar SA, Mengiste T, Betsuyaku S, Parker JE, Müssig C, Thomma BPHJ, Albrecht C, de Vries SC, Hirt H, Nürnberger T (2007) The BRI1-Associated Kinase 1, BAK1, Has a Brassinolide-Independent Role in Plant Cell-Death Control. *Curr Biol* 17:1116–1122. doi: 10.1016/j.cub.2007.05.046
- Kirk PJ (1970) Neutral red as a lipid fluorochrome. *Stain Technol* 45:1–4. doi: 10.3109/10520297009063373
- Komai F, Okuse I, Harada T (1995) Histological Identification of Somatic Embryogenesis from Excised Root Tissues of Spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Plant Tissue Cult Lett* 12:313–315.

- Komai F, Masuda K, Harada T, Okuse I (1996a) Plant regeneration from adventitious roots of spinach (*Spinacia oleracea* L.) grown from protoplasts. *Plant Sci* 120:89–94. doi: 10.1016/S0168-9452(96)04463-9
- Komai F, Okuse I, Harada T (1996b) Somatic embryogenesis and plant regeneration in culture of root segments of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Plant Sci* 113:203–208. doi: 10.1016/0168-9452(95)04285-7
- Kuehnle AR, Chen F, Sugii N (1992) PlantCell Reports Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium andraeanum* hybrids. *Plant Cell Rep* 11:438–442.
- Kwaaitaal M a CJ, De Vries SC (2007) The *SERK1* gene is expressed in procambium and immature vascular cells. *J Exp Bot* 58:2887–2896. doi: 10.1093/jxb/erm103
- Laskowski MJ, Williams ME, Nusbaum HC, Sussex IM (1995) Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development* 121:3303–3310.
- Li J, Wen J, Lease KA, Doke JT, Tax FE, Walker JC (2002) BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell* 110:213–222. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00812-7
- Li X, Fang Y-H, Han JD, Bai SN, Rao GY (2014) Isolation and Characterization of a Novel SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE Gene Expressed in the Fern *Adiantum capillus-veneris* During Shoot Regeneration In Vitro. *Plant Mol Biol Report*. doi: 10.1007/s11105-014-0769-2
- Ma J, He Y, Hu Z, Xu W, Xia J, Guo C, Lin S, Chen C, Wu C, Zhang J (2014) Characterization of the third *SERK* gene in pineapple (*Ananas comosus*) and analysis of its expression and autophosphorylation activity *in vitro*. *Genet Mol Biol* 37:530–539. doi: 10.1590/S1415-47572014000400009
- Ma J, He Y, Wu C, Liu H, Hu Z, Sun G (2012) Cloning and Molecular Characterization of a *SERK* Gene Transcriptionally Induced During Somatic Embryogenesis in *Ananas comosus* cv. Shenwan. *Plant Mol Biol Report* 30:195–203. doi: 10.1007/s11105-011-0330-5
- Malinowski R, Filipecki M (2002) The role of cell wall in plant embryogenesis. *Cell Mol Biol Lett* 7:1137–1151.
- Merkle SA, Parrott WA, Flinn BS (1995) Morphogenic Aspects of Somatic Embryogenesis. In: Thorpe TA (org) *Vitr. Embryog. Plants*. Springer Netherlands, Dordrecht, p 155–204
- Mikuła A, Rybczyński JJ (2001) Somatic embryogenesis of *Gentiana* genus I. The effect of the preculture treatment and primary explant origin on somatic embryogenesis of

- Gentiana cruciata* (L.), *G. pannonica* (Scop.), and *G. tibetica* (King). Acta Physiol Plant 23:15–25. doi: 10.1007/s11738-001-0017-x
- Mikuła A, Tykarska T, Rybczyński JJ, Kuras M (2002) Ultrastructural analysis of initial stages of differentiation of root explants of *Gentiana cruciata* seedlings. Acta Soc Bot Pol 71:287–297. doi: 10.5586/asbp.2002.034
- Mikula A, Tykarska T, Zielinska M, Kuras M, Rybczynski JJ (2004) Ultrastructural changes in zygotic embryos and somatic embryogenesis of *Gentiana punctata* L. during callus formation and somatic embryogenesis. Acta Biol Cracoviensia Ser Bot 46:109–120.
- Mikula A, Wesolowska M, Kapusta J, Skrzypczak L, Rybczynski JJ (1996) Cytomorphological studies on somatic embryogenesis of *Gentiana tibetica* (King) and *G. cruciata* (L.). Acta Soc Bot Pol 65:47–51.
- Motamayor JC, Mockaitis K, Schmutz J, Haiminen N, Iii DL, Cornejo O, Findley SD, Zheng P, Utro F, Royaert S, Saski C, Jenkins J, Podicheti R, Zhao M, Scheffler BE, Stack JC, Feltus FA, Mustiga GM, Amores F, Phillips W, Marelli JP, May GD, Shapiro H, Ma J, Bustamante CD, Schnell RJ, Main D, Gilbert D, Parida L, Kuhn DN (2013) The genome sequence of the most widely cultivated cacao type and its use to identify candidate genes regulating pod color. Genome Biol 14:r53. doi: 10.1186/gb-2013-14-6-r53
- Moura EF, Ventrella MC, Motoike SY, Sá Júnior AQ, Carvalho M, Manfio CE (2008) Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius). Plant Cell Tissue Organ Cult 95:175–184. doi: 10.1007/s11240-008-9430-9
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Naing AH, Min JS, Park KI, Chung MY, Lim SH, Lim KB, Kim CK (2013) Primary and secondary somatic embryogenesis in *Chrysanthemum* (*Chrysanthemum morifolium*) cv. “Baeksun” and assessment of ploidy stability of somatic embryogenesis process by flow cytometry. Acta Physiol Plant 35:2965–2974. doi: 10.1007/s11738-013-1328-4
- Nair RR, Gupta SD (2006) High-frequency plant regeneration through cyclic secondary somatic embryogenesis in black pepper (*Piper nigrum* L.). Plant Cell Rep 24:699–707. doi: 10.1007/s00299-005-0016-2
- Nam KH, Li J (2002) BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. Cell 110:203–212. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00814-0

- Namasivayam P (2007) Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. *Plant Cell ,Tissue Organ Cult* 90:1–8. doi: 10.1007/s11240-007-9249-9
- Nhut DT, Tuan NS, Ngoc HM, Uyen PN, Don NT, Mai NT, Teixeira da Silva JA (2006) Somatic embryogenesis induction from *in vitro* leaf culture of lisianthus (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.). *Propag Ornament Plants* 6:121–127.
- Nolan KE, Irwanto RR, Rose RJ (2003) Auxin Up-Regulates *MtSERK1* Expression in Both *Medicago truncatula* Root-Forming and Embryogenic Cultures. *Plant Physiol* 133:218–230. doi: 10.1104/pp.103.020917.218
- Nolan KE, Kurdyukov S, Rose RJ (2009) Expression of the *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1 (SERK1)* gene is associated with developmental change in the life cycle of the model legume *Medicago truncatula*. *J Exp Bot* 60:1759–71. doi: 10.1093/jxb/erp046
- O'Brien TP, McCully ME (1981) The study of plant structure principles and selected methods. Termarcaphi Pty Ltda., Melbourne, Australia
- Otoni WC, Paim-Pinto Lopes D, Rocha DI, Vieira ML, Dias CLL., Silva LM, Silva VC, Lani GRE, Silva CL, Tanaka OFA (2013) Organogenesis and somatic embryogenesis in passionfruit (*Passiflora* spp.). In: Aslam J, Srivastava PS, Sharma MP (orgs) *Somat. Embryogenes. gene Expr.* Narosa, India, p 1–17
- Pareek A, Kothari S. (2003) Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf cultures of ornamental species of *Dianthus*. *Sci Hortic (Amsterdam)* 98:449–459. doi: 10.1016/S0304-4238(03)00078-5
- Park SY, Ahn JK, Lee W-Y, Murthy HN, Paek KY (2005) Mass production of *Eleutherococcus koreanum* plantlets via somatic embryogenesis from root cultures and accumulation of eleutherosides in regenerants. *Plant Sci* 168:1221–1225. doi: 10.1016/j.plantsci.2004.12.023
- Perez-Núñez MT, Chan JL, Saenz L, González T, Verdeil JL, Oropeza C (2006) Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) plumule explants. *Vitr Cell Dev Biol* 42:37–43. doi: 10.1079/IVP2005722
- Pérez-Núñez MT, Souza R, Sáenz L, Chan, JL, Zúñiga-Aguilar JJ, Oropeza C (2009) Detection of a *SERK*-like gene in coconut and analysis of its expression during the formation of embryogenic callus and somatic embryos. *Plant Cell Rep* 28:11–19. doi: 10.1007/s00299-008-0616-8
- Pinheiro MVM, Martins FB, Cruz ACF, Carvalho ACPP, Oliveira EJ, Otoni, WC (2014) Somatic embryogenesis in anthurium (*Anthurium andraeanum* cv. Eidibel) as affected by different explants. *Acta Sci Agron* 36:87. doi: 10.4025/actasciagron.v36i1.16557

- Podio M, Felitti SA, Siena LA, Delgado L, Mancini M, Seijo JG, González AM, Pessino SC, Ortiz JPA (2014) Characterization and expression analysis of *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE (SERK)* genes in sexual and apomictic *Paspalum notatum*. *Plant Mol Biol* 84:479–95. doi: 10.1007/s11103-013-0146-9
- R Core Team (2014) Software R: A language and environment for statistical computing versão 3.0.3.
- Radoeva T, Weijers D (2014) A roadmap to embryo identity in plants. *Trends Plant Sci* 1–8. doi: 10.1016/j.tplants.2014.06.009
- Rai MK, Shekhawat NS (2013) Recent advances in genetic engineering for improvement of fruit crops. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 116:1–15. doi: 10.1007/s11240-013-0389-9
- Rawlins TE, Takahashi WN (1952) Techniques of plant histochemistry and virology. The National Press, California.
- Reis E, Batista MT, Canhoto JM (2008) Effect and analysis of phenolic compounds during somatic embryogenesis induction in *Feijoa sellowiana* Berg. *Protoplasma* 232:193–202. doi: 10.1007/s00709-008-0290-2
- Rekik I, Elleuch A, Kriaa W, Drira N (2013) Molecular cloning and *in silico* analysis of three somatic embryogenesis receptor kinase mRNA from date palm. *Genetika* 45:837–853. doi: 10.2298/GENSR1303837R
- Rocha DI, Dornelas MC (2013) Molecular overview on plant somatic embryogenesis. *CAB Rev* 8:17. doi: 10.1079/PAVSNR20138022
- Rocha DI, Monte-Bello CC, Dornelas MC (2014) Alternative induction of de novo shoot organogenesis or somatic embryogenesis from *in vitro* cultures of mature zygotic embryos of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) is modulated by the ratio between auxin and cytokinin in the medium. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* doi: 10.1007/s11240-014-0663-5
- Rocha DI, Vieira LM, Tanaka FAO, da Silva LC, Otoni WC (2012a) Anatomical and ultrastructural analyses of *in vitro* organogenesis from root explants of commercial passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 111:69–78. doi: 10.1007/s11240-012-0171-4
- Rocha DI, Vieira LM, Tanaka FAO, da Silva LC, Otoni WC (2012b) Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. *Protoplasma* 249:747–58. doi: 10.1007/s00709-011-0318-x

- Ruduś I, Kępczyńska E, Kępczyński J (2002) Regulation of *Medicago sativa* L. somatic embryogenesis by gibberellins. *Plant Growth Regul* 36:91–95. doi: 10.1023/A:1014751125297
- Ruffoni B, Damiano C, Massabò F, Esposito P (1990) Organogenesis and embryogenesis in *lisanthus russellianus* Hook. *Acta Hort* 280:83–88.
- Sagare A, Lee Y, Lin T, Chen C, Tsay H (2000) Cytokinin-induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Corydalis yanhusuo* (Fumariaceae) — a medicinal plant. *Plant Sci* 160:139–147. doi: 10.1016/S0168-9452(00)00377-0
- Saitou N, Nei M (1987) The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425.
- Sakamoto T, Deguchi M, Brustolini OJB, Santos AA, Silva FF, Fontes EPB (2012) The tomato RLK superfamily: phylogeny and functional predictions about the role of the LRR-II-RLK subfamily in antiviral defense. *BMC Plant Biol* 12:229. doi: 10.1186/1471-2229-12-229
- Salaj J, von Recklinghausen IR, Hecht V, Vries SC, Schel JHN, van Lammeren AAM. (2008) *AtSERK1* expression precedes and coincides with early somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem* 46:709–714. doi: 10.1016/j.plaphy.2008.04.011
- Sambrook J, Russel DW (2001) Molecular cloning – a laboratory manual, 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Sané D, Aberlenc-Bertossi F, Gassama-Dia YK, Sagna M, Trouslot MF, Duval Y, Borgel A (2006) Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). *Ann Bot* 98:301–308. doi: 10.1093/aob/mcl104
- Santos M, Romano E, Yotoko KSC, Tinoco MLP, Dias B, Aragão FJL (2005) Characterisation of the cacao *somatic embryogenesis receptor-like kinase (SERK)* gene expressed during somatic embryogenesis. *Plant Sci* 168:723–729. doi: 10.1016/j.plantsci.2004.10.004
- Savona M, Mattioli R, Nigro S, Falasca G, Della RF, Costantino P, Vries S, Ruffoni B, Trovato M, Altamura MM (2012) Two *SERK* genes are markers of pluripotency in *Cyclamen persicum* Mill. *J Exp Bot* 63:471–488. doi: 10.1093/jxb/err295
- Scatena VL, Scremin-Dias E (2012) Parênquima, Colênquima e Esclerênquima. In: Apezatto da Gloria B, Carmello-Guerreiro SM (orgs) *Anat. Veg.*, 3a. edn. Editora UFV, Viçosa, MG, p 105–122

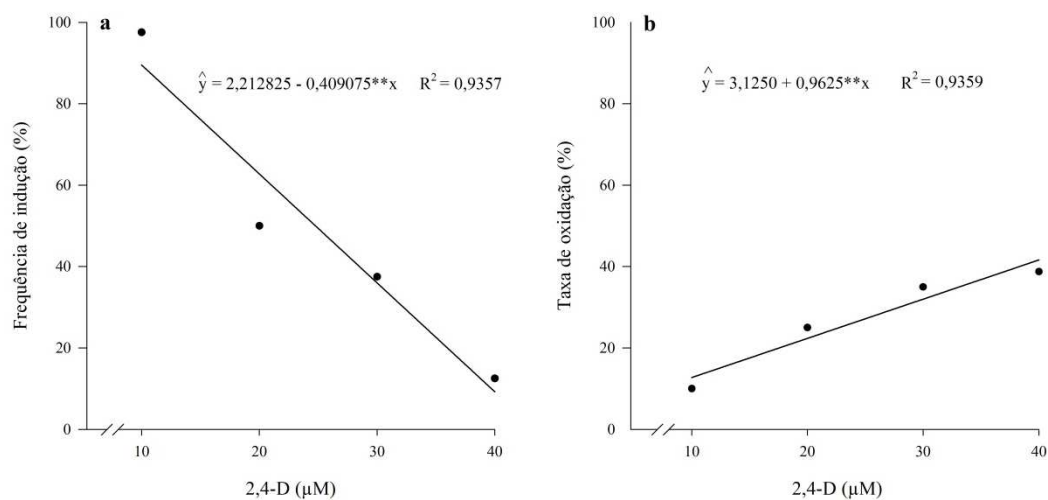
- Schellenbaum P, Jacques A, Maillot P, Bertsch C, Mazet F, Farine S, Walter B (2008) Characterization of *VvSERK1*, *VvSERK2*, *VvSERK3* and *VvL1L* genes and their expression during somatic embryogenesis of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Rep* 27:1799–1809. doi: 10.1007/s00299-008-0588-8
- Schmidt ED, Guzzo F, Toonen MA, de Vries SC (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development* 124:2049–2062.
- Shang HH, Liu CL, Zhang CJ, Li FL, Hong WD, Li FG (2009) Histological and ultrastructural observation reveals significant cellular differences between *Agrobacterium* transformed embryogenic and non-embryogenic calli of Cotton. *J Integr Plant Biol* 51:456–465. doi: 10.1111/j.1744-7909.2009.00824.x
- Sharma SK, Millam S, Hein I, Bryan GJ (2008) Cloning and molecular characterisation of a potato *SERK* gene transcriptionally induced during initiation of somatic embryogenesis. *Planta* 228:319–330. doi: 10.1007/s00425-008-0739-8
- Sharma VK, Hänsch R, Mendel RR, Schulze J (2005) Mature embryo axis-based high frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from multiple cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Exp Bot* 56:1913–1922. doi: 10.1093/jxb/eri186
- Shibli R a., Duwayri M a., Sawwan JS, Shatnawi MA, Al-Qudah TS (2012) Regeneration via somatic embryogenesis of the endangered wild arum (*Arum palaestinum*). *Vitr Cell Dev Biol - Plant* 48:335–340. doi: 10.1007/s11627-012-9438-z
- Silva AT, Barduche D, do Livramento KG, Ligterink W, Paiva LV (2014) Characterization of a Putative *Serk-Like* Ortholog in Embryogenic Cell Suspension Cultures of *Coffea arabica* L. *Plant Mol Biol Report* 32:176–184. doi: 10.1007/s11105-013-0632-x
- Singla B, Khurana JP, Khurana P (2008) Characterization of three somatic embryogenesis receptor kinase genes from wheat, *Triticum aestivum*. *Plant Cell Rep* 27:833–843. doi: 10.1007/s00299-008-0505-1
- Sivanesan I, Lim MY, Jeong BR (2011) Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf and petiole explants of *Campanula punctata* Lam. var. *rubriflora* Makino. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 107:365–369. doi: 10.1007/s11240-011-9983-x
- Smertenko A, Bozhkov P V (2014) Somatic embryogenesis: life and death processes during apical-basal patterning. *J Exp Bot* 65:1343–60. doi: 10.1093/jxb/eru005
- Somleva MN, Schmidt EDL, de Vries SC (2000) Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by *SERK* expression. *Plant Cell Rep* 19:718–726. doi: 10.1007/s002999900169

- Soundar RC, Kathiravan K, Aslam A, Shajahan A (2012) An efficient regeneration system via somatic embryogenesis in mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.). Plant Cell, Tissue Organ Cult 112:387–393. doi: 10.1007/s11240-012-0244-4
- Sá SP, Guimarães A, Oliveira A, Siqueira FJ, Fontana PA, Damaseno FP, Branco CRC, Branco A, Almeida SG (2012) Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Selaginellaceae). Rev Ciências Farm Básica e Apl 33:561–566.
- Steiner N, Santa-Catarina C, Guerra MP, Cutri L, Dornelas MC, Floh EIS (2012) A gymnosperm homolog of SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE-1 (*SERK1*) is expressed during somatic embryogenesis. Plant Cell Tissue Organ Cult 109:41–50. doi: 10.1007/s11240-011-0071-z
- Suprasanna P, Sidha M (2013) Somatic Embryogenesis Receptor Kinase (*SERK*) and regulation of embryogenesis in plants. In: Aslam J, Srivastava PS, Sharma MP (orgs) Somat. Embriogenes. Gene Expr., 1º edn. Narosa, India, p 188–200
- Talapatra S, Ghoshal N, Raychaudhuri S Sen (2014) Molecular characterization, modeling and expression analysis of a somatic embryogenesis receptor kinase (*SERK*) gene in *Momordica charantia* L. during somatic embryogenesis. Plant Cell Tissue Organ Cult 116:271–283. doi: 10.1007/s11240-013-0401-4
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol 28:2731–9. doi: 10.1093/molbev/msr121
- Thomas C, Meyer D, Himber C, Steinmetz A (2004) Spatial expression of a sunflower *SERK* gene during induction of somatic embryogenesis and shoot organogenesis. Plant Physiol Biochem 42:35–42. doi: 10.1016/j.plaphy.2003.10.008
- Twyford CT, Mantell SH (1996) Production of somatic embryos and plantlets from root cells of the Greater Yam. Plant Cell Tissue Organ Cult 46:17–26. doi: 10.1007/BF00039692
- Verdeil, J.-L., Alemanno, L., Niemenak, N., Tranbarger, T.J., 2007. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? Trends Plant Sci. 12, 245–52. doi:10.1016/j.tplants.2007.04.002
- Vidal CB (1977) Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. Cell Mol Biol 22:45–64.

- Von Arnold S (2008) Somatic Embryogenesis. In: George EF, Hall MA, Klerk GJ (orgs) Plant Propagation by Tissue Culture, 3rd edn. Springer Netherlands, p. 335–354. doi:10.1007/978-1-4020-5005-3_1
- Wan L, Yang X, Gui M, Qu S, Su Y, Zhou X (2009) *In vitro* anther culture and plant induction of *Eustoma russellianum*. Southwest China J Agric Sci 22:1424 – 1427.
- Wang QJ, Zheng LP, Yuan HY, Wang J (2013) Propagation of *Salvia miltiorrhiza* from hairy root explants via somatic embryogenesis and tanshinone content in obtained plants. Ind Crops Prod 50:648–653. doi: 10.1016/j.indcrop.2013.08.031
- Wang XD, Nolan KE, Irwanto RR, Sheahan MB, Rose RJ (2011) Ontogeny of embryogenic callus in *Medicago truncatula*: The fate of the pluripotent and totipotent stem cells. Ann Bot 107:599–609. doi: 10.1093/aob/mcq269
- Williams, E. G. and Maheswaran G (1986) Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. Ann Bot 57:443–462.
- Wu HJ, Wang XX, Li Y, Zhang DG, Zhang B, Wang XY (2011) Propagation of *Gentiana macrophylla* (Pall) from hairy root explants via indirect somatic embryogenesis and gentiopicoside content in obtained plants. Acta Physiol Plant 33:2229–2237. doi: 10.1007/s11738-011-0762-4
- Wu Y, Zhou JM (2013) Receptor-like kinases in plant innate immunity. J Integr Plant Biol 55:1271–1286. doi: 10.1111/jipb.12123
- Xavier A, Wendling I, Silva RL (2009) Propagação *in vitro* de Espécies Florestais. In: Xavier A, Wendling I, Silva RL (orgs) Silvicultura clonal, 1^o edn. Editora UFV, Viçosa, p 152–209
- Xu C, Zhao L, Pan X, Samaj J (2011) Developmental localization and methylesterification of pectin epitopes during somatic embryogenesis of banana (*Musa* spp. AAA). PLoS One 6:e22992. doi: 10.1371/journal.pone.0022992
- Xu P, Zhang Z, Wang B, Xia X, Jia J (2012) Somatic embryogenesis and plant regeneration in chrysanthemum (*Yuukou*). Plant Cell, Tissue Organ Cult 111:393–397. doi: 10.1007/s11240-012-0201-2
- Yang C, Zhao T, Yu D, Gai J (2011) Isolation and Functional Characterization of a *SERK* Gene from Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). Plant Mol Biol Report 29:334–344. doi: 10.1007/s11105-010-0235-8
- Yang JL, Seong ES, Kim MJ, Ghimire BK, Kang WH, Yu CY, Li CH (2009) Direct somatic embryogenesis from pericycle cells of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) root explants. Plant Cell, Tissue Organ Cult 100:49–58. doi: 10.1007/s11240-009-9615-x

- Yang DC, Choi Y-E (2000) Production of transgenic plants via *Agrobacterium rhizogenes* - mediated transformation of *Panax ginseng*. *Plant Cell Rep* 19:491–496. doi: 10.1007/s002990050761
- Yeung E, Meinke D (1993) Embryogenesis in Angiosperms: Development of the Suspensor. *Plant Cell* 5:1371–1381. doi: 10.1105/tpc.5.10.1371
- Zakizadeh H, Stummann BM, Lütken H, Müller R (2010) Isolation and characterization of four somatic embryogenesis receptor-like kinase (*RhSERK*) genes from miniature potted rose (*Rosa hybrida* cv. Linda). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 101:331–338. doi: 10.1007/s11240-010-9693-9
- Zavattieri MA, Frederico AM, Lima M, Sabino R, Arnholdt-Schmitt B (2010) Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. *Electron J Biotechnol* 13:1–9. doi: 10.2225/vol13-issue1-fulltext-4
- Zhang N, Fang W, Shi Y, Liu Q, Yang H, Gui R, Lin X (2010) Somatic embryogenesis and organogenesis in *Dendrocalamus hamiltonii*. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 103:325–332. doi: 10.1007/s11240-010-9783-8
- Zhang S, Liu X, Lin Y, Xie G, Fu F, Liu H, Wang J, Gao S, Lan H, Rong T (2011) Characterization of a *ZmSERK* gene and its relationship to somatic embryogenesis in a maize culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 105:29–37. doi: 10.1007/s11240-010-9834-1
- Zhao J, Cui J, Liu J, Liao F, Henny RJ, Chen J (2012) Direct somatic embryogenesis from leaf and petiole explants of *Spathiphyllum* “Supreme” and analysis of regenerants using flow cytometry. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 110:239–249. doi: 10.1007/s11240-012-0146-5
- Zhou Q, Jiang Z, Huang T (2010) Plant regeneration via somatic embryogenesis from root explants of *Hevea brasiliensis*. *African J Biotechnol* 9:8168–8173. doi: 10.5897/AJB10.969
- Zimmerman JL (1993) Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. *Plant Cell* 5:1411–1423. doi: 10.1105/tpc.5.10.1411
- Zimmermann MJ (2010) Embriogênese somática. In: Cid Barreto LP (org) *Cultivo in vitro* de plantas. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF, p. 67–101.
- Zlenko VA, Kotikov I V, Troshin LP (2002) Efficient GA₃-assisted plant regeneration from cell suspensions of three grape genotypes via somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 70:295–299. doi: 10.1023/A:1016593227463

FIGURAS E LEGENDAS



**Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

Fig. 2 Frequência de indução (a) e taxa de oxidação (b) de explantes radiculares de lisianthus (*Eustoma grandiflorum* 'Abc 2-3 Rose'), em função da concentração de 2,4-D no meio de indução de embriogênese somática, avaliadas aos 40 d de cultivo *in vitro*.

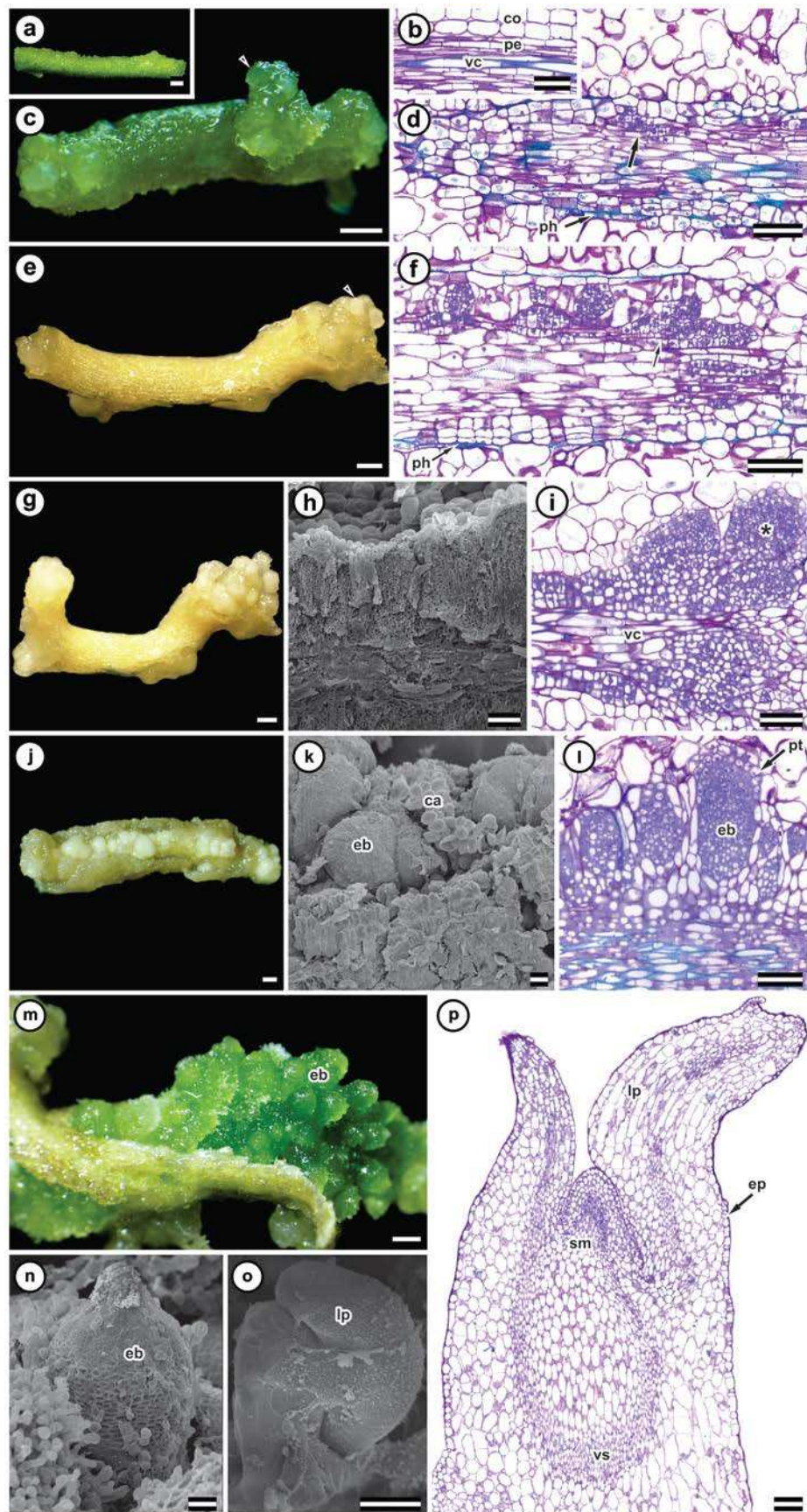


Fig. 2 Embriogênese somática de lisianthus, *Eustoma grandiflorum*, a partir de segmentos radiculares, caracterizada mediante estereomicroscopia, microscopia de luz e eletrônica de varredura. Explante no tempo 0 (**a, b**); Detalhe em estereomicroscopia (**a**); Secção longitudinal-tangencial: córtex; periciclo e sistema vascular (**b**); Após 10 d da introdução no meio de indução (**c, d**); Início de calogênese (►) (**c**); Divisões anticlinais (seta) e núcleos volumosos na região do periciclo (**d**); Após 20 d no meio de indução (**e, f**); Desenvolvimento da calogênese (**e**); Divisões periclinais e anticlinais (seta) (**f**); Após 30 d da introdução no meio de indução (**g, h, i**); Diferenciação de zonas pró-embriogênicas (*) e cilindro vascular sofrendo desorganização (**i**); Após 40 d da introdução no meio de indução: Embriões somáticos (**j, k, l**), com formação de protoderme (**l**); Após 20 d da introdução do material no meio de maturação (**m, n**); Início de maturação, observa-se assincronia da maturação dos embriões (**m**); Embrião somático em desenvolvimento (**n**); Embrião maduro com 30 d (**o**); Observa-se primórdios foliares, domo apical, e endoderme (**p**). *Abreviaturas:* ca: calos; co: córtex; eb: embrião; ep: epiderme; lf: primórdio foliar; pe: periciclo; ph: compostos fenólicos; pt: protoderme; sm: meristema apical; vc: cilindro vascular; vs: sistema vascular. Barras: a, c, e, g, j, m – 500 µm; b, d, f, h, i, k, l, n, o, p: 100 µm

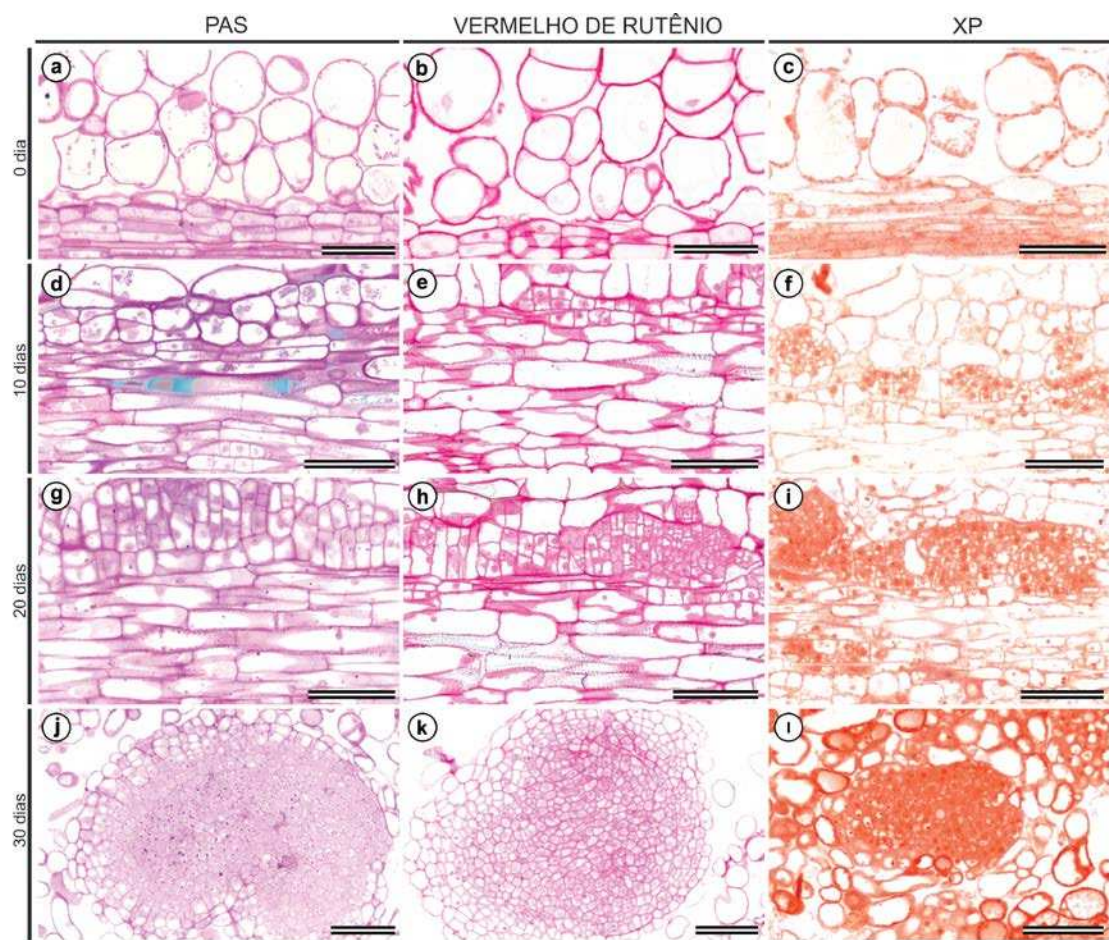


Fig. 3 Estudos histoquímicos da embriogênese somática de *Eustoma grandiflorum*, a partir de segmentos radiculares. Secções longitudinais-tangenciais submetidas ao ácido periódico/reagente de Schiff – PAS (**a, d, g, j**); vermelho de rutênio (**b, e, h, k**) e XP (**c, f, i, l**) Reação positiva para grãos de amido e carboidratos totais (**a, d, g, j**). Reação positiva para vermelho de rutênio evidenciando a presença de pectina na parede celular aos 0, 10, 20 e 30 d no meio de indução de calos embriogênicos (**b, e, h, k**). Proteínas totais coradas de vermelho (**c, f, i, l**). Barras: a-l – 100 μ m

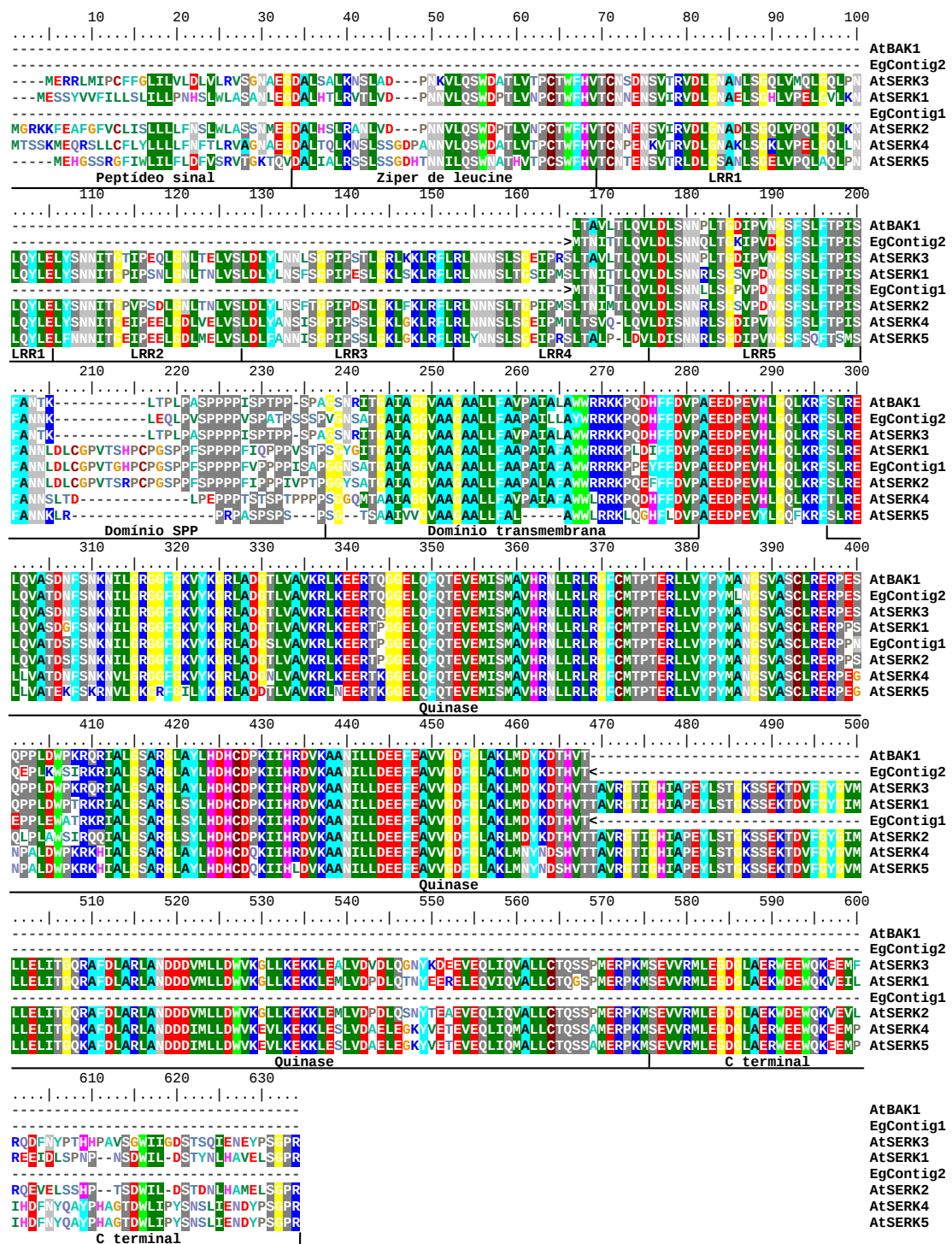


Fig. 4 Comparação das sequências de aminoácidos deduzidas dos contigs 1 e 2 de *E. grandiflorum* com homólogos de SERK disponíveis no banco de dados. Os domínios estruturais foram indicados por retângulo abaixo do alinhamento. LRR1-5: domínio contendo os motivos repetitivos de leucina (*Leucine Rich Repeats*); SPP: região rica em prolina; C-terminal: domínio carboxi-terminal. Gaps incluídos para otimização do alinhamento são indicados por “-”.

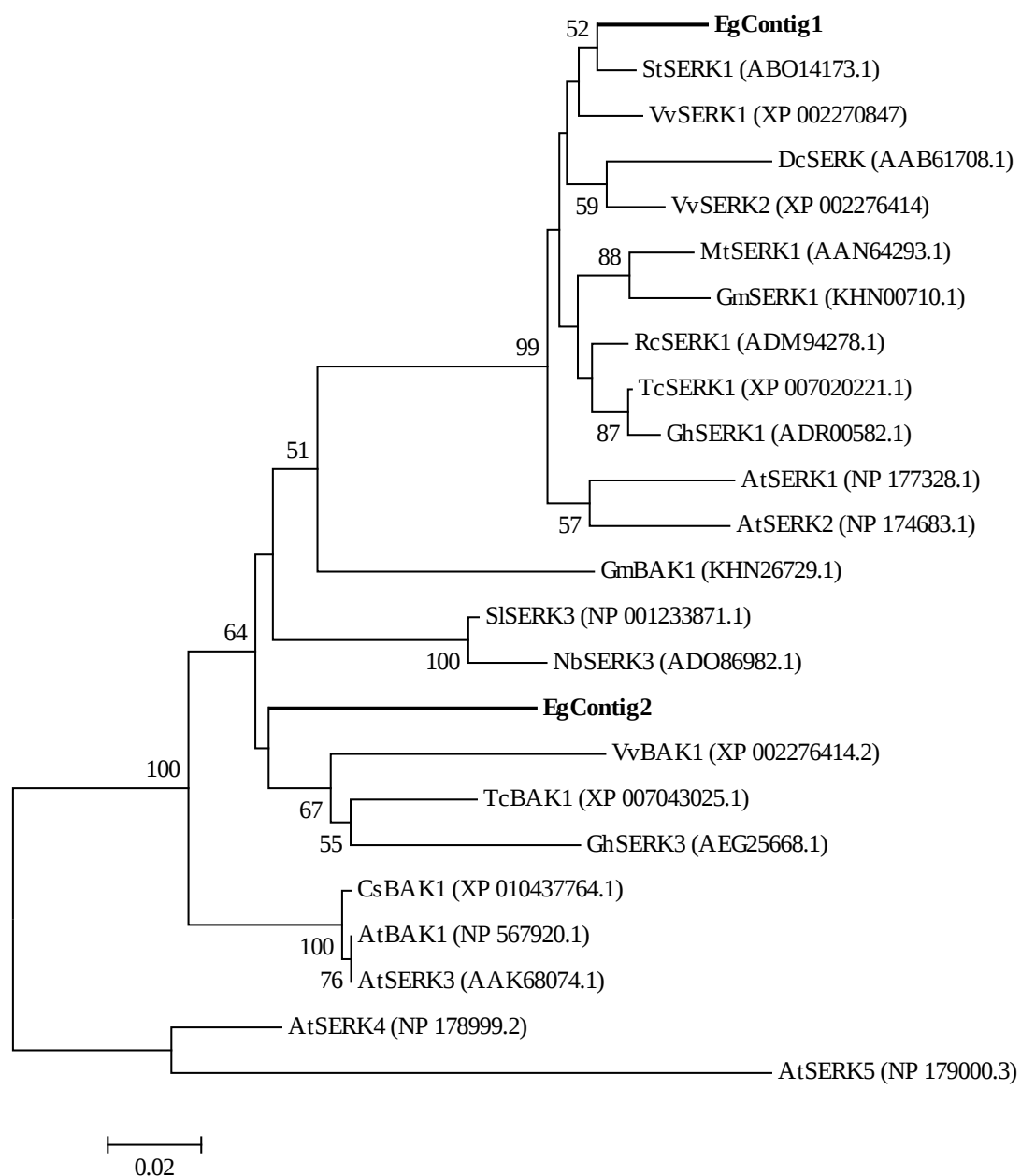


Fig. 5 Inferência das relações filogenéticas entre homólogos da proteína SERK com base nas sequências parciais de aminoácidos deduzidas. As sequências dos diferentes homólogos foram alinhadas e foi gerada uma matriz de distância para construção do cladograma por Neighbor-Joining. Os números indicam valores de Bootstrap, em porcentagem (1.000 repetições), sendo apresentados apenas valores acima de 50%. Os contigs de *E. grandiflorum* são destacados em negrito, as letras e números entre parênteses indicam o código de acesso no banco de dados do NCBI. AtSERK1, AtSERK2, AtSERK3, AtSERK4, AtSERK5 e AtBAK1 (*Arabidopsis thaliana*); CsBAK1 (*Camelina sativa*); DcSERK (*Daucus carota*); GhSERK1 e GhSERK3 (*Gossypium hirsutum*); GmSERK1 e GmBAK1 (*Glycine max*); MtSERK1 (*Medicago truncatula*); NbSERK3 (*Nicotiana benthamiana*); RcSERK1 (*Rosa canina*); SISERK3 (*Solanum lycopersicum*); StSERK1 (*Solanum tuberosum*); TcSERK1 e TcBAK1 (*Theobroma cacao*), VvSERK1, VvSERK2 e VvBAK1 (*Vitis vinífera*).

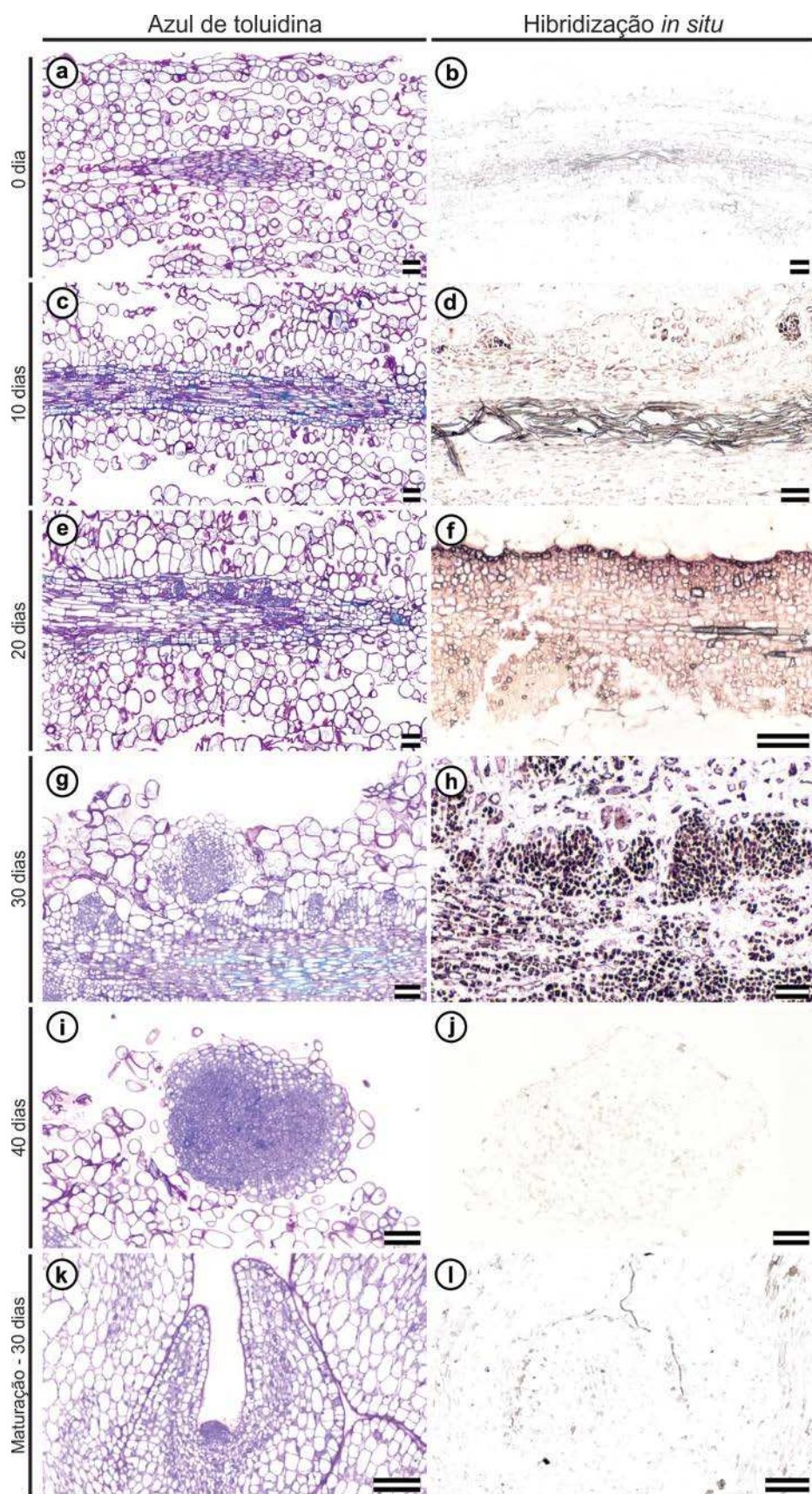


Fig. 6 Localização dos transcritos do gene *SERK* por hibridização *in situ* de segmentos radiculares de *E. grandiflorum*. Explante no tempo 0 (**a, b**); Secção longitudinal-tangencial: córtex; periciclo e sistema vascular (**a**); Secção longitudinal-tangencial: hibridizado com sonda anti-senso. (**b**); Após 10 d da introdução no meio de indução (**c, d**); Divisões anticlinais e núcleos volumosos na região do periciclo (**c**); Divisões anticlinais: hibridizado com sonda anti-senso (**d**); Após 20 d no meio de indução (**e, f**); Divisões periclinais e anticlinais (**e**); Divisões periclinais e anticlinais: hibridizado com sonda anti-senso (**f**); Após 30 d da introdução no meio de indução (**g, h**); Diferenciação de zonas pró-embriogênicas (**g**); Diferenciação de zonas pró-embriogênicas: hibridizado com sonda anti-senso (**h**); Após 40 d da introdução no meio de indução (**i, j**); Embriões somáticos (**i**); Embriões somáticos: hibridizado com sonda anti-senso (**j**); Após 30 d da introdução do material no meio de maturação (**k, l**); Embrião maduro com 30 d (**k**); Embrião maduro com 30 d: hibridizado com sonda anti-senso (**l**) Barras: a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l – 100

CAPÍTULO 3: PRODUÇÃO DE MUDAS, CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS DE LISIANTHUS (*Eustoma grandiflorum*) ORIUNDAS DE SEMENTES VERNALIZADAS.

RESUMO - A exposição de cultivares de *E. grandiflorum* a temperaturas elevadas, durante e após a germinação das sementes pode levar à indução da formação da planta em roseta, inibindo o florescimento. Uma das técnicas utilizadas para evitar este distúrbio fisiológico a exposição das sementes ou mudas a determinados períodos de frio, fenômeno denominado vernalização, permite o crescimento e desenvolvimento normal das plantas, bem como diferenciação da gema vegetativa em reprodutiva. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da exposição das sementes hidratadas a diferentes períodos (12, 24, 36 e 48 d) e temperaturas (5, 10 e 15 °C) de vernalização no crescimento e desenvolvimento de plantas de três cultivares de lisianthus [Excalibur White, Echo Lavender e Mariachi, F1 (Sakata Seed[®])] e propor um sistema produtivo com tecnologia de produção de mudas e de cultivo de lisianthus para flor de corte. Ao longo do cultivo observou-se comportamento diferencial entre as cultivares utilizadas em relação ao tratamento de vernalização. Os resultados observados das plantas oriundas de sementes vernalizadas a 15 °C foram similares aos resultados das plantas oriundas de sementes não vernalizadas para as três cultivares. Além disso, a porcentagem de plantas induzidas ao florescimento e o ciclo de cultivo das plantas oriundas de sementes vernalizadas apresentaram menores valores médios em relação à testemunha. Por outro lado, observaram-se diferenças significativas nas características fitotécnicas avaliadas que determinam o padrão de comercialização de lisianthus em função dos tratamentos. Constatando-se que todas as plantas produziram hastes florais dentro dos padrões exigidos pelo mercado, enquadrando-se dentro da melhor categoria de comercialização. De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que a vernalização de sementes de lisianthus cv. Mariachi, Echo e Excalibur levou à maior eficiência na indução do florescimento e redução do ciclo de cultivo. Deste modo, recomenda-se vernalizar as sementes a 5 °C durante 48 d antes do cultivo, para produção de mudas de lisianthus de alta qualidade.

Palavras-chave: vernalização de semente, floricultura, produção de mudas de lisianthus.

SEEDLING PRODUCTION, GROWTH AND DEVELOPMENT OF LYSIANTHUS (*Eustoma grandiflorum*) PLANTS GROWN FROM VERNALIZED SEEDS.

ABSTRACT – High temperature exposure of *E. grandiflorum* cultivars during and after seed germination can induce rosette formation in plants and inhibit bolting. Among the techniques used to avoid this physiological disorder, one of them is the exposure of seeds or seedlings to cold temperatures for certain periods of time. This treatment, named vernalization, allows plants to grow and develop normally, permitting the differentiation of the vegetative bud into a reproductive one. The aim of this study was to evaluate how growth and development of three lisianthus cultivars can be influenced by hydrating seeds during different periods of time (12, 24, 36 and 48 days) and exposing them to several vernalization temperatures (5, 10 and 15 °C) in order to provide a productive system for lisianthus seedling and cut flower production. Throughout the lisianthus lifecycle different behaviors were observed among the varieties in response to vernalization treatments. Longer hydrating periods and lower temperatures resulted in higher percentages of bolting plants as well as shorter lifecycles. However, the results observed in seeds vernalized at 15 °C were the same as those of non-vernalized seeds in the three lisianthus cultivars. Plants grown from vernalized seeds presented lower mean values for percentage of bolting plants and lifecycle when compared to the control treatment. Significant differences were observed between the treatments for plant parameters considered in the lisianthus market. However all plants produced flowers within the standards required by the lisianthus market, and all treatments fit in the best category. According to the results obtained in this study, we conclude that vernalization of lisianthus seeds (cultivars Mariachi, Echo and Excalibur) leads to greater bolting efficiency as well as a reduction in crops lifecycle. Consequently, seed vernalization at 5 °C for 48 days before planting is recommended in order to obtain high quality lisianthus seedlings.

Keywords: seed vernalization, floriculture, lisianthus seedling production.

INTRODUÇÃO

Entende-se a floricultura como atividade agrícola de produção intensiva e de cunho empresarial que trata da produção e da comercialização de flores e plantas ornamentais. Nesta linha de pensamento o agronegócio da floricultura no Brasil ganha qualidade e competitividade e o desempenho nas últimas décadas tem sido bastante satisfatório. As estimativas publicadas pelo Ibraflor (2013) indicam que a área envolvida na atividade de plantas e flores ornamentais no Brasil, em 2013, foi de 13.800 ha, estimando-se para o ano de 2014 um crescimento do setor na ordem de 8 a 10%.

O mercado dos produtos da floricultura está segmentado em quatro grupos: bulbos, mudas, flores e folhagens. Têm-se ainda plantas vivas, em vasos ou de raiz, para fins ornamentais. Em termos de produção de flores-de-corte, destacam-se as rosas, o crisântemo, a gérbera, a gipsofila e mais recentemente, o lisianthus vem ganhando maior atenção.

O lisianthus, *Eustoma grandiflorum*, espécie ornamental originária da região sul dos Estados Unidos e norte do México, pertencente à família Gentianaceae, foi introduzido no Brasil no final da década de 1980 tornando-se muito popular como flor-de-corte e planta envasada. Na natureza, no inverno, tem crescimento lento em forma de roseta; o alongamento do ramo ocorre na primavera e o florescimento no verão (Dole e Wilkins 2005a). É uma espécie herbácea com caule ereto que, dependendo das técnicas culturais, pode ser de ciclo anual ou bienal, sendo cultivada como planta anual, tolerante a geadas, exigindo temperaturas amenas para seu bom desenvolvimento (Lorenzi e Moreira de Souza 2008).

Esta espécie apresenta ampla variabilidade genética com relação a muitas características importantes, como, taxa de crescimento, formato da folha, coloração das flores, morfologia da inflorescência, sensibilidade ao etileno e ciclo de desenvolvimento (Alves 2012) particularmente sensibilidade à temperatura e ao fotoperíodo inibindo ou induzindo o florescimento. Assim, em função do comportamento varietal em relação ao fotoperíodo, as cultivares de *E. grandiflorum* foram classificadas como plantas de dia neutro e de dia longo facultativas. As plantas de dia neutro são aquelas que não são respondentes à duração do dia (Salisbury e Ross 1992). Por outro lado, o florescimento das

plantas de dia longo facultativas é diretamente influenciado pela temperatura e fotoperíodo (Harbaugh 2007).

A exposição de cultivares de *E. grandiflorum* a temperaturas elevadas, durante e após a germinação das sementes pode levar à indução da formação da planta em roseta inibindo o florescimento. O crescimento em forma de roseta é um distúrbio fisiológico, que inibe o alongamento dos entrenós, com folhas crescendo radialmente muito próximas entre si. Isso resulta em um agregado compacto ou rosetas de folhas, caracterizado pela redução do crescimento internodal, não ocorrendo emissão da haste floral (Taiz e Zeiger 2013), comprometendo a produção comercial do lisianthus.

Para evitar o rosetamento é necessário fornecer temperaturas médias de 23/18°C dia/noite, respectivamente, até a formação do segundo ou terceiro par de folhas uma vez que após esse estágio a sensibilidade da plântula diminui (Roh et al 1989; Harbaugh e Roh 1992). Outra técnica para evitar este distúrbio fisiológico é a exposição das sementes ou mudas a determinados períodos de frio, fenômeno denominado vernalização, permitindo o crescimento e desenvolvimento normal das plantas, bem como diferenciação da gema vegetativa em reprodutiva.

A vernalização é o processo pelo qual o florescimento é promovido por um tratamento de frio dado a uma semente completamente hidratada (embebida em água) ou a uma planta em crescimento. Sem o tratamento de frio, as plantas que exigem a vernalização retardam o florescimento ou permanecem no estágio vegetativo, crescendo em forma de roseta. Em geral as espécies diferem grandemente quanto à idade na qual se tornam sensíveis à vernalização. Assim por exemplo, as anuais de inverno, são respondentes a baixas temperaturas no início do ciclo de vida (Taiz e Zeiger 2004).

No cultivo de *E. grandiflorum* este distúrbio fisiológico é limitante para indução da planta ao florescimento, principalmente nas épocas mais quentes do ano. Mudanças com mais de seis pares de folhas e com crescimento anormal (baixo porte e/ou entrenós curtos) são consideradas rosetadas e devem ser descartadas. Plantas rosetadas podem retornar ao crescimento normal após serem vernalizadas durante um período determinado (Roh et al 1989; Harbaugh e Roh 1992).

A emissão da haste floral e alongamento do caule em *E. grandiflorum* são governados pela rota das giberelinas (GAs) (Hisamatsu et al 1999; Oka et al 2001;

Hisamatsu et al 2004). Estudos realizados em *Eustoma grandiflorum* e *Arabidopsis thaliana* sugerem que os sinais que regulam a expressão dos genes das GAs estão sob controle da temperatura, uma vez que, após a vernalização de plantas rosetadas desencadeia-se a biossíntese de GAs (Oka et al 2001) culminando com o florescimento. No entanto, a transição floral em *lisianthus* é regulada pela interação da vernalização e o fotoperíodo, que também é governada pela rota das GAs (Nakano et al 2011).

As GAs estão envolvidas no alongamento do caule, germinação, incluindo a quebra de dormência e a mobilização das reservas do endosperma. No desenvolvimento reprodutivo as GAs podem afetar a transição do estado juvenil para o maduro, bem como a indução da floração (Taiz e Zeiger 2013). A aplicação de giberelinas nas plantas é feita comumente para promover o alongamento da haste, assim como para induzir a floração. Assim, o uso de GAs em plantas que assumem a forma de roseta resulta em alongamento do caule, processo naturalmente regulado pela GA endógena (Dole e Wilkins 2005b).

Trabalhos sobre vernalização de sementes foram propostos para diferentes cultivares de *lisianthus* (Kageyama et al., 1990; Pergola et al., 1992; Tanigawa et al., 2002), assim como sobre vernalização de mudas de *lisianthus* (Ohkawa et al 1991; Harbaugh e Roh 1992; Pergola 1992; Ohkawa et al 1993; Ohkawa et al 1994; Harbaugh 1995). Entre as vantagens encontradas para a vernalização de *lisianthus* tem-se aumento da taxa de germinação das sementes, maior porcentagem de plantas induzidas ao florescimento, mudas mais uniformes e de alta qualidade, o que vai refletir em aumento de produtividade de plantas mais valorizadas pelo mercado, resultando portanto, em maior retorno econômico para o produtor.

Na produção comercial de mudas de *lisianthus* utiliza-se a vernalização das sementes ou das plântulas com a finalidade de evitar o rosetamento (Sakata 2012) possibilitando o alongamento do caule e florescimento da planta após o transplântio das mudas. Devido a alta diversidade genética do *lisianthus* não se conhece a ciência certa a faixa efetiva de temperatura para vernalização das sementes, sugerindo-se entre 1 °C (congelamento) e 10 °C. A vernalização requer várias semanas de exposição a baixas temperaturas as quais variam amplamente com a espécie e com a cultivar (Kim et al 2009), indicando a necessidade de pesquisas, a fim de se estabelecer o manejo mais adequado para *E. grandiflorum*, o qual é determinante na produção e qualidade final das flores.

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da exposição das sementes hidratadas a diferentes períodos e temperaturas de vernalização no crescimento e desenvolvimento de plantas de três cultivares de lisianthus, bem como disponibilizar um sistema produtivo com tecnologia de produção de mudas e de cultivo de lisianthus para flor de corte.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no delineamento em blocos casualizados em esquema fatorial 3 x 4 + 1 tratamento adicional, para três cultivares: Excalibur White, Echo Lavender e Mariachi, F1 (Sakata Seed®). A escolha das cultivares foi feita pela alta aceitação do mercado, bem como pelo fato de as mesmas apresentarem diferentes níveis de sensibilidade ao rosetamento. As sementes foram expostas a três temperaturas de vernalização (5, 10 e 15 °C) por quatro períodos (12, 24, 36 e 48 d) com três repetições e três plantas por unidade experimental. O tratamento adicional foi constituído de sementes não expostas às temperaturas de vernalização, para cada variedade.

As sementes foram semeadas em substrato comercial Bioplant® em bandejas plásticas com 288 células (célula de 18 mL: 2 x 2 x 4,5 cm) colocando-se uma semente em cada célula, a qual foi preenchida. Feita a semeadura as mesmas foram umedecidas e cobertas com sacos plásticos para manter a umidade elevada e cobertas com papel alumínio para evitar a exposição à luminosidade. Logo após, as bandejas foram colocadas nas BODs de acordo com as temperaturas e períodos de vernalização estabelecidos. Após a exposição ao frio, as sementes foram cobertas com plástico e colocadas para germinar em BODs a 25 °C. Em seguida, foram levadas para a climatização e formação das mudas sob câmara de crescimento, coberta com plástico e sombrite com restrição de 50 %. Nesta etapa, a irrigação foi feita com microaspersores através de sistema automatizado aplicando-se irrigação por 2 seg a cada 15-30 min de acordo com a necessidade.

Para a fertilização foi aplicado fertilizante comercial (Peters Professional®) contendo N 20 %; P₂O₅ 20 %; K₂O 20 %; Mg 0,05 %; B 0,0068 %; Cu 0,0036 %; Fe 0,05 %; Mn 0,025 %; Mo 0,0009 % e Zn 0,0025 %. A aplicação foi realizada após a emergência dos cotilédones, com doses de 0,125 g L⁻¹, duas vezes por semana.

O transplântio das mudas para vasos de 10 L, foi realizado quando estas apresentaram de quatro a cinco pares de folhas. Os vasos foram preenchidos com 9 L da mistura constituída por substrato comercial, areia e casca de arroz carbonizada, na proporção 6:2:3 respectivamente. Nesse momento adicionou-se 1 g L⁻¹ de fertilizante (10-10-10) sendo transplantadas 3 plantas/vaso. A aplicação de defensivos foi realizada de acordo à necessidade. A ferti-irrigação das plantas foi feita semanalmente com fertilizante B&G Flores Violeta contendo N 6,147 %; P₂O₅ 4,121 %; K₂O 8,162 %; Ca 2,559 %; Mg

0,579 %; S 1,836 %; Cl 3,108 %; Mo 0,003 %; B 0,052 %; Fe 0,217 %; Zn 0,138 %; Cu 0,040 %; Mn 0,099 %; Ni 0,010 % e Na 0,116 %. Optou-se pelo uso deste fertilizante devido à semelhança entre o conteúdo de nutrientes de violeta e lisianthus.

O experimento foi conduzido no período de dezembro/2013 a junho/2013, durante todo o experimento os dados meteorológicos diários de temperatura máxima e mínima foram registrados em Datalog instalado no centro da casa-de-vegetação, a 1,5 m de altura. O fotoperíodo foi calculado pela equação de Cooper (1969).

As avaliações realizadas foram: plantas induzidas ao florescimento (%), ciclo de cultivo, em dias, expresso pelo período compreendido entre o plantio das mudas e o ponto de colheita, comprimento da haste; em cm, medida 2 cm acima da superfície do substrato ao ponto mais alto da haste; diâmetro da base da haste, em mm, medido 2 cm acima da superfície do substrato; massa fresca e seca total/haste em g. As massas fresca e seca de cada parte da planta foram determinadas separadamente; área foliar (cm²) medida com “Area Meter”, modelo Li-Cor 3100 (LI-COR Biosciences, Inc Lincoln, Nebraska); número de flores abertas/haste e número de folhas/haste. Para determinação da massa seca, as partes, em separado, foram colocadas em sacos de papel, acondicionadas em estufa a 60 °C por 96 h e após este período, pesadas em balança de precisão.

Todas as variáveis foram submetidas à análise de variância e, quando constatada a significância, as médias foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey a 5 % de significância. A comparação com o tratamento adicional (testemunha) foi feita pelo teste Dunnett a 5 %. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o *software* R versão 3.0.3 (R Core Team 2014) com auxílio do pacote ExpDes versão 1.1.2 (Ferreira et al 2013) e do pacote Easynova (Arnhold 2014). Os gráficos foram plotados no software Sigma Plot® (versão 11.0).

RESULTADOS

Caracterização do ambiente de cultivo

A representação gráfica das temperaturas ao longo do cultivo de *lisianthus*, mostra que durante a fase de formação da plântula a temperatura média diurna foi de 24,2 °C e a noturna de 21,3 °C. A temperatura diurna máxima registrada neste período foi de 27,8 °C e noturna de 24,3 °C (Fig. 1a). Por outro lado, a UR média registrada na fase de formação da muda foi de 87,3 % (Fig. 1b). O fotoperíodo durante esta fase de formação da plântula oscilou entre 12,85 - 12,16 h/d (Fig. 1c).

Na fase reprodutiva a temperatura média diurna foi de 19,8 °C e noturna de 15,9 °C (Fig. 2a). O valor médio da UR durante o ciclo de cultivo foi de 81,1 % (Fig. 2b). Por sua vez, o fotoperíodo máximo nesta fase foi de 12,22 h/d no mês de março, sendo que o mínimo foi de 10,73 h/d no mês de junho (Fig. 2c).

Efeitos da vernalização de sementes nas características de crescimento e desenvolvimento de plantas de *lisianthus* cv. *Mariachi*

Para a cultivar *Mariachi* foi observada diferença significativa entre os tratamentos e a testemunha para porcentagem de plantas induzidas ao florescimento, ciclo de cultivo, diâmetro da haste, massas fresca e seca total da haste, área foliar e número de flores abertas/haste (Tabela 1).

Para a porcentagem de plantas induzidas ao florescimento, as plantas oriundas de sementes vernalizadas geraram maiores valores médios com diferença significativa em relação à testemunha (66,7 %), com exceção das plantas oriundas de sementes vernalizadas durante 12 d a 10 ou 15 °C e 48 d a 15 °C (77,8; 77,8 e 66,7 %; respectivamente) cujos valores médios não apresentaram diferença significativa em relação aos observados nas plantas provenientes de sementes não submetidas ao frio.

O ciclo de cultivo das plantas oriundas de sementes não vernalizadas foi de 190,7 d, sendo este valor estatisticamente maior em comparação com todos os tratamentos de vernalização de sementes utilizadas, cujo ciclo médio foi de 154 d.

Por outro lado, as hastes florais oriundas de sementes não vernalizadas geraram em média 91,6 g de massa fresca por haste, diferindo estatisticamente dos valores obtidos em relação às sementes vernalizadas por 24 ou 48 d a 5 °C, assim como daquelas vernalizadas

durante 48 d a 10 °C ou 24 d a 15 °C. Por outro lado, o valor médio de massa seca total da haste da testemunha foi de 14,2 g, sendo maior que os valores observados nos tratamentos de vernalização, porém sem diferença significativa da massa seca total das hastes provenientes de sementes vernalizadas durante 12, 24 ou 36 d a 5 ou 10 °C e 12 ou 36 d a 15 °C.

A área foliar das plantas provenientes de sementes não vernalizadas mostrou maior valor médio em relação às das vernalizadas, sem ser estatisticamente diferente da área foliar das plantas oriundas de sementes vernalizadas durante 12 d a 5 ou 15 °C.

Foram observadas diferenças significativas para os valores médios de diâmetro entre as plantas obtidas de sementes não vernalizadas (0,59 cm) e vernalizadas. Assim também, o número de flores abertas/haste foi superior quando as sementes não foram vernalizadas (16,3), porém somente com diferença significativa com as plantas oriundas de sementes vernalizadas durante 48 d a 10 °C (8,94).

Constatou-se o efeito da temperatura e do período de vernalização na porcentagem de plantas induzidas ao florescimento. Maior porcentagem de plantas induzidas (97,2 %) foi observada nas sementes vernalizadas a 5 °C, sem apresentar diferença significativa daquelas vernalizadas a 10 °C (91,7 %). Por outro lado, as sementes que permaneceram durante 24 d sob vernalização, independentemente da temperatura, induziram maior porcentagem de plantas ao florescimento, não diferindo estatisticamente das plantas oriundas de sementes que permaneceram por 36 ou 48 d sob vernalização (Tabela 2a).

Os ciclos de cultivo observados nas plantas oriundas de sementes vernalizadas durante 24; 36 ou 48 d foram de 151,48; 152,8 ou 150,5 d, respectivamente, não se observando diferenças significativas; porém as plantas provenientes de sementes vernalizadas por 12 d apresentaram ciclo médio de cultivo de 161,8 d diferindo estatisticamente das plantas oriundas de sementes submetidas aos outros períodos de frio (Tabela 2b).

Para massa seca observou-se diferenças significativas entre os valores obtidos nos períodos de vernalização independentemente da temperatura utilizada, sendo que as sementes que permaneceram 12 d sob frio originaram maior valor médio de massa seca total da planta (12,44 g) sem se observar diferença significativa em relação à massa seca das hastes das plantas procedentes de sementes vernalizadas por 36 d (Tabela 2c).

Não houve diferença significativa para área foliar e número de flores abertas/haste em função dos períodos de vernalização utilizados entre as sementes que foram vernalizadas durante 12, 24 ou 36 d. As sementes vernalizadas durante 12 d, independentemente da temperatura utilizada, originaram plantas cujos valores médios de área foliar ($727,1 \text{ cm}^2$) e número de flores abertas/haste (13,9) (Tabelas 2d e 2e, respectivamente).

Os períodos de vernalização aplicados afetaram o diâmetro das hastes, constatando-se que os valores médios do diâmetro das hastes das plantas oriundas de sementes vernalizadas durante 12, 24 e 36 d, de 5,3; 4,8 e 4,9 mm, semelhantes entre si, e superiores ao diâmetro das hastes de plantas oriundas de sementes vernalizadas por 48 d, de 4,7 mm (Tabela 2f).

Realizou-se a classificação das plantas de acordo ao ciclo de cultivo estabelecendo-se três categorias: < 160 d; 160-180 d e >190 d. De acordo com a figura 3, constatou-se que a vernalização das sementes a 5 °C, 10 °C ou 15 °C, levou à redução do ciclo de cultivo das plantas, obtendo-se mais de 75 % de hastes colhidas em ciclo igual ou inferior a 160 d, com exceção das sementes vernalizadas durante 12 d a 10 °C (33,33 %) ou durante 12 ou 36 d a 15 °C (14,2; 50 %, respectivamente). Por outro lado, o ciclo de cultivo das plantas oriundas de sementes não vernalizadas foi superior a 190 d em mais de 75 % das plantas.

Efeitos da vernalização de sementes nas características de crescimento e desenvolvimento de plantas de *lisianthus* cv. Echo

Os tratamentos de frio 24 d a 5 °C; 48 d a 5 °C ou 48 d a 10 °C aplicados as sementes de *lisianthus* cv. Echo, proporcionaram 100% de plantas induzidas ao florescimento, porém não mostraram diferença significativa em relação às plantas oriundas de sementes não vernalizadas (88,9 %). Assim também as sementes vernalizadas por 36 d - 5 °C ou 36 d - 10 °C geraram 88,9% de plantas induzidas ao florescimento. Por outro lado, os tratamentos 24 d - 15 °C ou 36 d - 15 °C possibilitaram 33,3 e 22,2 % de plantas induzidas ao florescimento, respectivamente, sendo estatisticamente diferentes da testemunha (Tabela 3).

Sementes vernalizadas a 10 °C por um período de 12, 24, 36 ou 48 d, possibilitaram 77,8; 55,6; 88,9 ou 100 % de plantas induzidas ao florescimento, sem se observar diferença significativa entre as médias obtidas em relação às plantas provenientes de sementes

submetidas a 12, 36 ou 48 d de frio. Por outro lado, plantas de sementes vernalizadas a 5 °C não apresentaram diferença significativa entre os valores obtidos para os diferentes períodos de vernalização (Tabela 4a).

O ciclo de cultivo das plantas de sementes vernalizadas a 5 °C (171,3 d) foi mais curto quando comparado com os ciclos de cultivo das plantas oriundas de sementes vernalizadas a 10 ou 15°C (181 e 188,6 d, respectivamente), não se observando diferença significativa em relação às das sementes vernalizadas a 10 °C. Por outro lado, menor ciclo de cultivo observado entre os períodos testados, independentemente da temperatura utilizada, ocorreu nas plantas oriundas de sementes vernalizadas durante 48 d a (172,8 d), não diferindo estatisticamente das plantas de sementes vernalizadas por 24 ou 36 d (Tabela 4b).

Foram observados valores médios de 52,3 e 49,7 cm para comprimento de haste nas plantas procedentes das sementes vernalizadas a 5 e 10 °C, respectivamente, sem se observar diferença significativa entre esses valores, independente do período de vernalização utilizado (Tabela 4c).

Realizou-se uma classificação das plantas de acordo com o ciclo de cultivo estabelecendo-se três categorias: < 160 d; 160-180 d e >190 d. Observou-se que sementes vernalizadas a 5 °C durante 24; 36 ou 48 d possibilitaram 50; 42,8 ou 37,5 % de plantas coletadas com ciclo < 160 d. Esse comportamento também foi observado nas plantas oriundas de sementes vernalizadas a 10 °C durante 48 d. No entanto, apenas 14,1 % das hastes foram coletadas com ciclo < 160 d em plantas provenientes de sementes não vernalizadas (Fig. 4).

Efeitos da vernalização de sementes nas características de crescimento e desenvolvimento de plantas de *lisianthus* cv. Excalibur

Houve diferenças significativas entre as plantas oriundas de sementes vernalizadas e não vernalizadas para o ciclo e massa fresca total da haste (Tabela 5). Observa-se que o ciclo de cultivo das plantas diminuiu com a vernalização das sementes em relação à plantas provenientes de sementes não vernalizadas quando se aplicaram os tratamentos: 36 d - 5 °C; 48 d - 5 °C; 12 d - 10 °C; 12 d - 15 °C ou 24 d - 15 °C.

Plantas de sementes vernalizadas durante 12 d e 10 °C mostraram menor valor médio de massa fresca total da haste (53 g) valor estatisticamente diferente em relação à

testemunha (88,6 g). Para os outros tratamentos não foram observadas diferenças significativas em relação à testemunha.

Não foram observadas diferenças significativas para todas as características avaliadas em função das diferentes temperaturas e períodos de vernalização utilizados. Embora, sem diferença significativa, observa-se que as sementes submetidas a 5 ou 10 °C proporcionaram 100 % de florescimento, enquanto para as sementes não vernalizadas este valor foi de 88,9 %.

Realizou-se uma classificação das plantas de acordo ao ciclo de cultivo estabelecendo-se três categorias: < 160 d; 160-180 d e >190 d. Observou-se que 75 % de plantas de *lisianthus* cv. Excalibur oriundas de sementes vernalizadas a 5 °C – 48 d foram colhidas com ciclo abaixo ou igual a 160 d. Assim, também, a vernalização a 10 ou 15 °C aumentou a porcentagem de plantas coletadas antes de 180 d, em comparação com as plantas oriundas de sementes não vernalizadas. Sementes sem vernalização originaram maior porcentagem (62,5 %) de plantas com ciclo de cultivo > 190 d (Fig. 5).

DISCUSSÃO

Caracterização do ambiente de cultivo

A temperatura durante todo o experimento oscilou bastante. Inicialmente as temperaturas registradas não foram as mais adequadas para formação das plântulas de lisianthus, contudo ao longo do cultivo houve diminuição da temperatura. O crescimento em roseta da maioria de cultivares de lisianthus é induzido quando as plântulas se desenvolvem num ambiente com temperaturas $\geq 25 - 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Ohkawa et al 1991; Harbaugh e Roh 1992; Pergola 1992; Ohkawa et al 1993; Ohkawa et al 1994; Harbaugh 1995). Porém, vários relatos indicam que temperaturas $> 21\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante o cultivo de lisianthus reduzem a qualidade das hastes florais (Harbaugh e Roh 1992). Dole & Wilkins (2005a), relatam que temperaturas noturnas acima de $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ na fase de formação da muda impedem a indução ao florescimento e as plantas podem permanecer vegetativas e se desenvolvem em roseta.

O estabelecimento do experimento nessa época do ano foi realizado visando proporcionar condições de temperaturas elevadas e inadequadas para a produção de mudas de lisianthus, com o objetivo de avaliar o comportamento varietal em resposta aos tratamentos de vernalização utilizados nas sementes. Por outro lado, as condições de fotoperíodo (DL) e UR (alta) foram adequadas para a formação das plântulas de lisianthus.

Avaliações fitotécnicas no ponto de colheita

Ao longo do cultivo de lisianthus das cvs. Mariachi, Echo e Excalibur observou-se comportamento diferencial das mesmas em relação ao tratamento de vernalização utilizado, assim como das condições ambientais na fase de produção de mudas. De acordo com a sensibilidade às altas temperaturas as cultivares de lisianthus podem ser classificadas em sensíveis, pouco sensíveis e tolerantes, apresentando crescimento em forma de roseta, semi-roseta ou normais, respectivamente (Fukuda et al., 1994; Harbaugh e Scott, 1999). As cultivares Mariachi e Echo pertencem ao grupo I (ciclo precoce) e II (ciclo médio) e são sensíveis ao rosetamento; no entanto, a cultivar Excalibur também pertence ao grupo II, tem baixa sensibilidade ao rosetamento (Sakata 2010).

No presente experimento foi observado que quanto menor for a temperatura e maior o tempo de duração da vernalização das sementes maior a porcentagem de plantas

induzidas ao florescimento, comportamento constatado para todas as cultivares estudadas. No entanto, a resposta foi mais evidente na cultivar Mariachi, já que as temperaturas elevadas na fase de formação das mudas causaram diminuição drástica da porcentagem de indução ao florescimento das plantas oriundas de sementes não vernalizadas. A indução ao florescimento é fator limitante na produção de flores de corte em lisianthus, sendo que as principais consequências do crescimento em roseta ou dormência das plântulas são a redução na produção, aumento do ciclo de cultivo, falta de uniformidade na colheita, redução da qualidade das hastes florais, além das plantas ficarem mais susceptíveis às doenças (Amasino, 2005; Kobori, 2012).

Kageyama et al. (1990) relataram que a porcentagem de plantas induzidas ao florescimento aumentou após a vernalização de sementes hidratadas de *E. grandiflorum*. Por sua vez, o tempo de duração, assim como a temperatura de vernalização são aspectos importantes que precisam ser considerados na hora de se fornecer baixas temperaturas. Assim, após trabalhos realizados com lisianthus observou-se que existe uma correlação positiva entre a duração do tempo de vernalização e a taxa de plântulas induzidas ao florescimento (Oka et al 2001).

Por sua vez, Tanigawa et al. (2002) estudaram o efeito da vernalização de sementes embebidas das cvs. Asukanoasa e Asukanosakura de lisianthus a 11 °C durante 0, 1, 3 ou 5 semanas. Os pesquisadores observaram aumento da taxa de germinação e da taxa de indução ao florescimento com o aumento do tempo de vernalização para as duas cultivares, assim como diminuição do tempo para emissão da haste floral em comparação com as plantas oriundas de sementes não vernalizadas. Comportamento similar foi observado após a vernalização de mudas de diferentes cultivares de lisianthus (Pergola 1992; Ohkawa et al 1994; Tanigawa et al 2001). Portanto, a vernalização se torna mais eficiente com a exposição prolongada a baixas temperaturas, da mesma forma que acontece na natureza num inverno típico (Amasino 2005).

Outra, das características avaliadas mais afetadas, foi o ciclo de cultivo, sendo mais marcante nas cvs. Mariachi e Excalibur, constatando-se redução de 40 e 30 d, respectivamente, do ciclo de cultivo das plantas oriundas de sementes vernalizadas a 5 °C durante 48 d quando comparadas com as plantas oriundas de sementes não vernalizadas. Da

mesma forma, Pergola (1992) concluiu que quanto maior tempo de vernalização sob temperatura menor, o tempo para a indução floral e colheita.

Na produção comercial de flores de corte torna-se de suma importância para os produtores reduzir o ciclo de cultivo e uniformizar a colheita. Estudos realizados com diferentes espécies têm demonstrado que a vernalização pode ser uma estratégia para atingir esses objetivos, assim como mostram experimentos sobre vernalização de espécies ornamentais como: *Lobelia x speciosa* (Runkle et al 1999), *Brunonia australis* (Cave e Johnston 2010), *Rhodanthe Floribunda* (Ha e Johnston 2013), *Lilium longiflorum* (Hamo et al 2015), entre outros.

No presente experimento fica evidente que a vernalização levou à uniformização e redução do ciclo de cultivo e que a vernalização das sementes a 15 °C foi menos efetiva em relação às outras temperaturas utilizadas para as três cultivares estudadas. Sabe-se que a temperatura efetiva e o tempo de exposição ao frio necessários para atingir o estado de vernalização varia entre as espécies e as cultivares (Kim et al 2009). Em lisianthus estudos indicam que a vernalização efetiva varia entre 3 – 15 °C. Assim, sementes vernalizadas a 3 ou 10 °C de *E. grandiflorum* cv. Fukushima não mostraram diferença significativa na taxa de indução ao florescimento (Ohkawa et al 1993). Da mesma forma, a vernalização de sementes hidratadas de lisianthus a 7 – 10 °C aumentou a taxa de germinação e a porcentagem de plantas induzidas ao florescimento notavelmente (Xi-heng et al 2011). Por outro lado, plântulas em estágio de dormência, foram induzidas ao florescimento após serem vernalizadas por 4 semanas a 15 °C (Ohkawa et al 1994).

No presente experimento plantas de sementes não vernalizadas atingiram o ponto de colheita, embora sob condições ambientais adversas como temperatura elevada na fase de formação da muda. Porém, nestas plantas, observou-se menor porcentagem de indução ao florescimento e maior duração do ciclo para todas as cultivares estudadas. O fato das plantas oriundas de sementes não vernalizadas terem completado o ciclo de cultivo pode estar relacionado com os dias longos e altas temperaturas na fase reprodutiva das plantas uma vez que a indução ao florescimento em *E. grandiflorum* está governado pelas rotas das GAs e do fotoperíodo, sendo que, a expressão e transcrição dos genes promotores ao florescimento em lisianthus: *Eustoma grandiflorum* *SOC1*-like (*EgSOC1L*) e *FT*-like (*EgFTL*) é ativada sob condições de dias quentes e longos (Nakano et al 2011).

Assim, estudos indicam que o crescimento e florescimento de plantas de *lisianthus* podem ser alcançados através da manipulação do fotoperíodo e/ou da temperatura (Harbaugh 1995). Por sua vez, Zaccari e Edri (2002) concluíram que a aplicação da vernalização e de dias longos têm efeito aditivo e, em alguns casos, esses tratamentos podem ser substituídos um pelo outro obtendo-se resultados semelhantes, comportamento que também foi observado no presente experimento, ficando patente, no entanto que a vernalização das sementes aprimorou os resultados.

Além dos benefícios citados anteriormente a vernalização pode afetar tanto a quantidade quanto a qualidade das flores/inflorescência (Ha 2014). Contudo, nenhum dos tratamentos de vernalização das sementes de *lisianthus* no presente experimento aumentou a qualidade das hastes em relação à das hastes oriundas de sementes não vernalizadas. Por sua vez, as sementes sem vernalização da cultivar Mariachi geraram plantas com maior número de flores abertas, diâmetro da haste, área foliar e massa fresca em comparação com as plantas oriundas de sementes vernalizadas, independente da temperatura utilizada. Este comportamento está relacionado com maior tempo de permanência no campo das plantas oriundas de sementes não vernalizadas, ou seja, maior tempo de cultivo, consequentemente, as plantas continuam fazendo fotossíntese, o que favorece a síntese de fotoassimilados, levando à maior translocação dos mesmos para as partes de interesse comercial das plantas.

Embora tenha havido diferenças significativas nas características fitotécnicas avaliadas que determinam o padrão de comercialização de *lisianthus* em função dos tratamentos, todas as plantas produziram hastes florais dentro dos padrões exigidos pelo mercado para *lisianthus*, enquadrando-se dentro da melhor categoria de comercialização. Segundo o critério de classificação de *lisianthus* pela Cooperativa Veiling Holambra (<http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=163>), entre as exigências adotadas pelo padrão de qualidade de *lisianthus* tem-se comprimento mínimo da haste de 40 cm, diâmetro da haste de no min 4 mm, peso fresco/haste preferivelmente em torno de 62,5 g, sendo que, está definido que o maço de *lisianthus* de corte deverá apresentar pelo menos 8 hastes por maço atingindo o peso de 500 g.

Observou-se diferenças significativas para área foliar apenas para a cv. Maricahi; enquanto não houve diferenças significativas para o número de folhas para nenhuma das cultivares estudadas. Resultados contraditórios a esse respeito foram observados na

literatura. Assim, Ohkawa et al. (1993), verificaram que o número de folhas foi inferior em plantas de *lisianthus* oriundas de sementes vernalizadas quando comparadas com plantas provenientes de sementes não vernalizadas. No entanto, Hisamatsu et al. (1999) observaram que plantas rosetadas e plantas com crescimento normal de *E. grandiflorum* apresentaram mesmo desenvolvimento foliar. Diante disto, os autores concluíram que embora a concentração de GAs seja menor nas plantas rosetadas esta foi suficiente para uma expansão foliar normal.

Diante dos resultados observados conclui-se que a vernalização a 5 e 10 °C de sementes de *Eustoma grandiflorum* cv. Mariachi, Echo e Excalibur levou à maior eficiência na indução do florescimento e redução do ciclo de cultivo. Já os resultados obtidos com a vernalização das sementes a 15 °C não mostraram diferenças significativas aos das sementes não vernalizadas para as três cultivares. Deste modo, recomenda-se vernalizar as sementes por 24 d a 5 °C para as cultivares Mariachi e Echo e para a cultivar Excalibur recomenda-se a vernalização das sementes por 36 d a 5 °C para a produção de mudas de *lisianthus* de alta qualidade com a finalidade de produção de plantas de flor de corte.

REFERÊNCIAS

- Alves L. M. C (2012) Produção e pós-colheita de lisianthus cultivado em ambiente protegido. 50.
- Amasino RM (2005) Vernalization and flowering time. *Curr Opin Biotechnol* 16:154–158. doi: 10.1016/j.copbio.2005.02.004
- Arnhold E (2014) Easyanova: Analysis of variance and other important complementary analyzes. R package version 4.0.
- Cave RL, Johnston ME (2010) Vernalization promotes flowering of a heat tolerant *Calandrinia* while long days replace vernalization for early flowering of *Brunonia*. *Sci Hortic (Amsterdam)* 123:379–384. doi: 10.1016/j.scienta.2009.10.004
- Cooper PI (1969) The absorption of radiation in solar stills. *Sol Energy* 12:333–346. doi: 10.1016/0038-092X(69)90047-4
- Dole JM, Wilkins HF (2005a) *Eustoma*. Floric. Princ. Species., 2^o edn. Pearson Prentice Hall, New Jersey, p 514–521
- Dole JM, Wilkins HF (2005b) Plant growth regulation. Floric. Princ. Species., 2^o edn. PEARSON Prentice Hall, New Jersey, p 141–161
- Ferreira EB, Cavalcanti PP, Nogueira DA (2013) ExpDes: Experimental Designs package versão 1.1.2.
- Fukuda BY, Kiyoshi F, Ohkawa R, et al (1994) Classification of *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn. Cultivars on Rosette Characteristics Ratios. *J Japanese Soc Hortic Sci* 62:845–856.
- Ha TM (2014) A Review of Plants' Flowering Physiology: The Control of Floral Induction by Juvenility, Temperature and Photoperiod in Annual and Ornamental Crops. *Asian J Agric Food Sci* 02:186–195.
- Ha TM, Johnston ME (2013) The Effect of Low Temperature on Flowering of *Rhodanthe Floribunda*. *Asian J Agric Food Sci* 1:205–209. doi: 10.1098/rspb.1925.0046
- Hamo ML, Villacorta C, Zaccari M (2015) Characterization of expressed sequence tags from *Lilium longiflorum* in vernalized and non-vernalized bulbs. *J Plant Physiol* 173:72–81. doi: 10.1016/j.jplph.2014.09.015
- Harbaugh BK (1995) Flowering of *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn. Cultivars influenced by photoperiod and temperature. *HortScience* 30:1375–1377.

- Harbaugh BK (2007) *Lisianthus Eustoma grandiflorum*. In: Anderson NO (org) Flower breeding and genetics issues, challenges and opportunities for the 21st century. Springer, Netherlands, p 644–663
- Harbaugh BK, Roh MS (1992) Rosetting of lisianthus cultivars exposed to high temperature. *HortScience* 27:885–887.
- Harbaugh BK, Scott JW (1999) “Florida Pink” and “Florida Light Blue”-Semi-dwarf Heat-tolerant Cultivars of *Lisianthus*. *HortScience* 34:364–365.
- Hisamatsu T, Koshioka M, Mander LN (2004) Regulation of gibberellin biosynthesis and stem elongation by low temperature in *Eustoma grandiflorum*. *J Hortic Sci Biotechnol* 79:354–359.
- Hisamatsu T, Koshioka M, Oyama N, Mander LN (1999) The relationship between endogenous gibberellins and rosetting in *Eustoma grandiflorum*. *J Japanese Soc Hortic Sci* 68:527–533.
- Ibraflor (2013) IBRAFLOR – Release Impresa. 000:1.
- Kageyama Y, Fukushima Y, Konishi K (1990) Effects of raising seedling at cool temperature and chilling treatment of seed on rosette formation of *Eustoma*. *J Jpn Soc Hort* 59:496–497.
- Kim D-H, Doyle MR, Sung S, Amasino RM (2009) Vernalization: winter and the timing of flowering in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25:277–299. doi: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113411
- Kobori M (2012) Produção de *Lisianthus* de corte. 13. Sakata, Atibaia-SP.
- Lorenzi H, Moreira de Souza H (2008) *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn. In: Lorenzi H, Moreira de Souza H (orgs) *Plantas Ornamentais no Bras.*, 4^o edn. Plantarum, São Paulo, p 615
- Nakano Y, Kawashima H, Kinoshita T, et al (2011) Characterization of *FLC*, *SOC1* and *FT* homologs in *Eustoma grandiflorum*: effects of vernalization and post-vernalization conditions on flowering and gene expression. *Physiol Plant* 141:383–93. doi: 10.1111/j.1399-3054.2011.01447.x
- Ohkawa K, Kano A, Kanematsu K, Korenaga M (1991) Effects of air temperature and time on rosette formation in seedlings of *Eustoma grandiflorum*. *Sci Agric* 48:171–176.
- Ohkawa K, Korenaga M, Yoshizumi T (1993) Influence of temperature prior to seed ripening and at germination on rosette formation and bolting of *Eustoma grandiflorum*. *Sci Hortic (Amsterdam)* 53:225–230.

- Ohkawa K, Yoshizumi T, Korenaga M, Kanematsu K (1994) Reversal of Heat-induced Resetting in *Eustoma grandiflorum* with Low Temperatures. HortScience 29:165–166.
- Oka M, Tasaka Y, Iwabuchi M, Mino M (2001) Elevated sensitivity to gibberellin by vernalization in the vegetative rosette plants of *Eustoma grandiflorum* and *Arabidopsis thaliana*. Plant Sci 160:1237–1245. doi: 10.1016/S0168-9452(01)00388-0
- Pergola G (1992) The need for vernalization in *Eustoma russellianum*. Sci Hortic (Amsterdam) 51:123–127.
- Roh M, Halevy AH, Wilkins HF (1989) *Eustoma grandiflorum*. In: A.H. Halevy (org) The Handbook of Flowering. p 322–327
- Runkle ES, Heins RD, Cameron AC, Carlson WH (1999) Cold treatment modifies the photoperiodic flowering response of *Lobelia x speciosa*. Sci Hortic (Amsterdam) 80:247–258. doi: 10.1016/S0304-4238(98)00249-0
- Sakata (2010) Sakata's reliable seeds Flower seed catalogue. 103. Atibaia-SP.
- Salisbury FB, Ross CW (1992a) Photoperiodism. Plant Physiol., 4a. edn. Wadsworth, California, p 504–530
- Taiz L, Zeiger E (2013a) Controle do florescimento. Fisiologia Vegetal, 5a. edn. Artmed, New Jersey, p 715–752
- Taiz L, Zeiger E (2013b) Giberelinas: Reguladores da altura das plantas e da germinação de sementes. Fisiol. Veg., 5a. edn. Artmed, New Jersey, p 582–618
- Taiz L, Zeiger E (2004) Células Vegetais. Fisiol. Veg., 3º edn. Artmed, Porto Alegre, p 29–55
- Tanigawa T, Kobayashi Y, Matsui H, Kunitake T (2001) effects of seedling age and high and low growth temperatures on bolting of *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn. Cultivars. J Japanese Soc Hortic Sci 70:501–509.
- Tanigawa T, Kuroyanagi N, Kunitake T (2002) Effects of low temperature treatment of imbibed seeds of *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn. on their germination and subsequent bolting. J Japanese Soc Hortic Sci 71:697–701.
- Xi-heng Z, Jin-cai LI, Yasuyo N (2011) Effects of Low Temperature Vernalization Treatment of Seeds of Lisianthus on Bolting. Acta Agric Boreali-Sinica 3:10503.
- Zaccai M, Edri N (2002) Floral transition in lisianthus (*Eustoma grandiflorum*). Sci Hortic 95:333–340.

TABELAS E LEGENDAS

Tabela 1. Porcentagem de plantas induzidas ao florescimento (IF) (%), ciclo de cultivo (CC) (dias), massa fresca/haste (MFT) (g), massa seca/haste (MST)(g), área foliar (AF) (cm²), diâmetro da haste (DH) (cm) e número de flores abertas (NFA) em função do período e da temperatura de vernalização utilizados para sementes de *E. grandiflorum* cv. Mariachi.

Tratamentos	IF	CC	MFT	MST	AF	DH	NFA
Testemunha	66,7	190,7	91,6	14,2	992,2	0,59	16,3
12d 5°C	88,9*	154,3*	74,4 ^{ns}	13,5 ^{ns}	691 ^{ns}	0,51 ^{ns}	13,6 ^{ns}
24d 5°C	100*	151*	58,5 ^{ns}	9,7 ^{ns}	532,1*	0,46*	11,4 ^{ns}
36d 5°C	100*	147,1*	62,4 ^{ns}	9,9 ^{ns}	561,8*	0,49 ^{ns}	9,31 ^{ns}
48d 5°C	100*	149,6*	58,9*	9,6*	573,7*	0,47*	10,9 ^{ns}
12d 10°C	77,8 ^{ns}	167,5*	69,9 ^{ns}	11,9 ^{ns}	680,3*	0,54 ^{ns}	13,5 ^{ns}
24d 10°C	100*	153*	66,9 ^{ns}	10,4 ^{ns}	678,7*	0,50 ^{ns}	12,6 ^{ns}
36d 10°C	88,9*	152,8*	60,5 ^{ns}	9,7 ^{ns}	579,3*	0,48*	12,9 ^{ns}
48d 10°C	100*	150,2*	55,85*	8,5*	519,1*	0,46*	8,9*
12d 15°C	77,8 ^{ns}	163,6*	73,1 ^{ns}	11,9 ^{ns}	809,9 ^{ns}	0,53 ^{ns}	14,8 ^{ns}
24d 15°C	100*	150,4*	57,1*	8,9*	559,5*	0,49*	10,6 ^{ns}
36d 15°C	88,9*	158,4*	67,5 ^{ns}	10,9 ^{ns}	664,4*	0,50 ^{ns}	11,2 ^{ns}
48d 15°C	66,7 ^{ns}	151,7*	61,9 ^{ns}	9,3*	571,9*	0,48*	9,2 ^{ns}

Médias seguidas de asterisco na coluna diferem do controle com base no teste de Dunnett, ao nível de 5 % (*) de probabilidade.

Tabela 2. Porcentagem de plantas induzidas ao florescimento (a); ciclo de cultivo (dias) (b); massa seca da haste (g) (c); área foliar (cm²) (d); flores abertas/hastes (e); diâmetro da haste (mm) (f) em função do período e da temperatura de vernalização utilizados para sementes de *E. grandiflorum* cv. Mariachi

(a)				(b)	
Temperatura		Período		Período	
5 °C	97,2 a	12 d	81,5 b	12 d	161,8 a
10 °C	91,7 ab	24 d	100 a	24 d	151,5 b
15 °C	83,3 b	36 d	92,6 ab	36 d	152,8 b
Testemunha 66,7*		48 d	88,9 ab	48 d	150,5 b
				Testemunha 190,7*	
(c)				(d)	
Período				Período	
12 d	12,4 a			12 d	727,1 a
24 d	9,7 b			24 d	590,1 ab
36 d	10,2 ab			36 d	601,8 ab
48 d	9,1 b			48 d	554,9 b
Testemunha 14,2**				Testemunha 992,2**	
(e)				(f)	
Período				Período	
12 d	13,9 a			12 d	0,53 a
24 d	11,5 ab			24 d	0,48 ab
36 d	11,2 ab			36 d	0,49 ab
48 d	9,7 b			48 d	0,47 b
Testemunha 16,3**				Testemunha 0,59**	

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Média da testemunha seguidas de asterisco diferem dos tratamentos pelo teste de Tukey a 1 % (**) ou 5 % (*) de probabilidade.

Tabela 3. Porcentagem de plantas induzidas ao florescimento (IF) em função do período e da temperatura de vernalização utilizados para sementes de *E. grandiflorum* cv. Echo.

Tratamentos	IF
Testemunha	88,9
12 d - 5 °C	77,8 ^{ns}
24 d - 5 °C	100 ^{ns}
36 d - 5 °C	88,9 ^{ns}
48 d - 5 °C	100 ^{ns}
12 d - 10 °C	77,8 ^{ns}
24 d - 10 °C	55,6 ^{ns}
36 d - 10 °C	88,9 ^{ns}
48 d - 10 °C	100 ^{ns}
12 d - 15 °C	66,7 ^{ns}
24 d - 15 °C	33,3*
36 d - 15 °C	22,2*
48 d - 15 °C	55,5 ^{ns}

Médias seguidas de asterisco na coluna diferem do controle com base no teste de Dunnett, ao nível de 5 % (*) de probabilidade.

Tabela 4. Porcentagem de plantas induzidas ao florescimento (a), ciclo de cultivo (dias) (b) e comprimento da haste (cm) (c), em função do período e da temperatura de vernalização utilizados para sementes de *E. grandiflorum* cv. Echo.

(a)				(b)			
	5 °C	10 °C	15 °C	Temperatura		Período	
12 d	77,8 Aa	77,8 Aab	66,7 Aa	5 °C	171,3 b	12 d	193 a
24 d	100 Aa	55,6 Bb	33,3 Bab	10 °C	181 ab	24 d	177,2 ab
36 d	88,9 Aa	88,9 Aab	22,2 Bb	15 °C	188,6 a	36 d	178,1 ab
48 d	100 Aa	100 Aa	55,6 Bab			48 d	172,8 b
Testemunha 88,9*				Testemunha 174,3 ^{ns}			

(c)	
Temperatura	
5 °C	52,3 a
10 °C	49,7 ab
15 °C	45,4 b
Testemunha 49,3 ^{ns}	

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Média da testemunha seguidas de asterisco diferem dos tratamentos pelo teste de Tukey a 5 % (*) de probabilidade.

Tabela 5. Ciclo de cultivo (dias), massa fresca/haste (g) e número de folhas em função do período e da temperatura de vernalização utilizados para sementes de *E. grandiflorum* cv. Excalibur.

Tratamentos	CC	MFT
Testemunha	188,7	88,6
12 d - 5 °C	166,9 ^{ns}	83,7 ^{ns}
24 d - 5 °C	165,7 ^{ns}	82,2 ^{ns}
36 d - 5 °C	161,8*	93,4 ^{ns}
48 d - 5 °C	157,6*	72,8 ^{ns}
12 d - 10 °C	160,3*	53,0*
24 d - 10 °C	173,1 ^{ns}	89,3 ^{ns}
36 d - 10 °C	160,1*	85,1 ^{ns}
48 d - 10 °C	160,9*	83,4 ^{ns}
12 d - 15 °C	163,6*	88,6 ^{ns}
24 d - 15 °C	164,1*	89,9 ^{ns}
36 d - 15 °C	165,3 ^{ns}	96,2 ^{ns}
48 d - 15 °C	172,7 ^{ns}	93,3 ^{ns}

Médias seguidas de asterisco na coluna diferem do controle com base no teste de Dunnett, ao nível de 5 % (*) de probabilidade.

FIGURAS E LEGENDAS

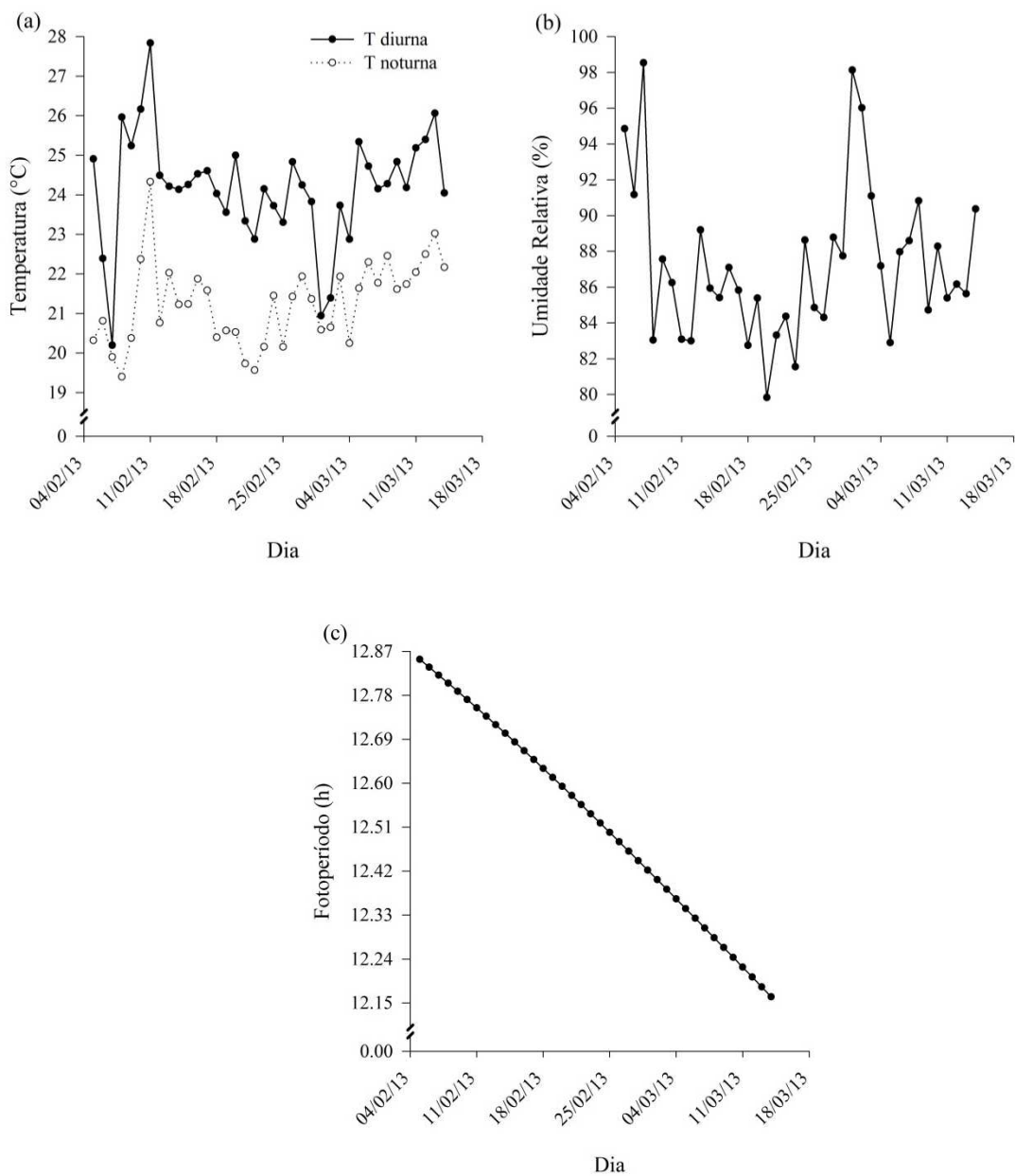


Fig. 3 Variação das temperaturas diurna e noturna (a), umidade relativa (b) e fotoperíodo (c) na fase de formação da plântula de *E. grandiflorum*.

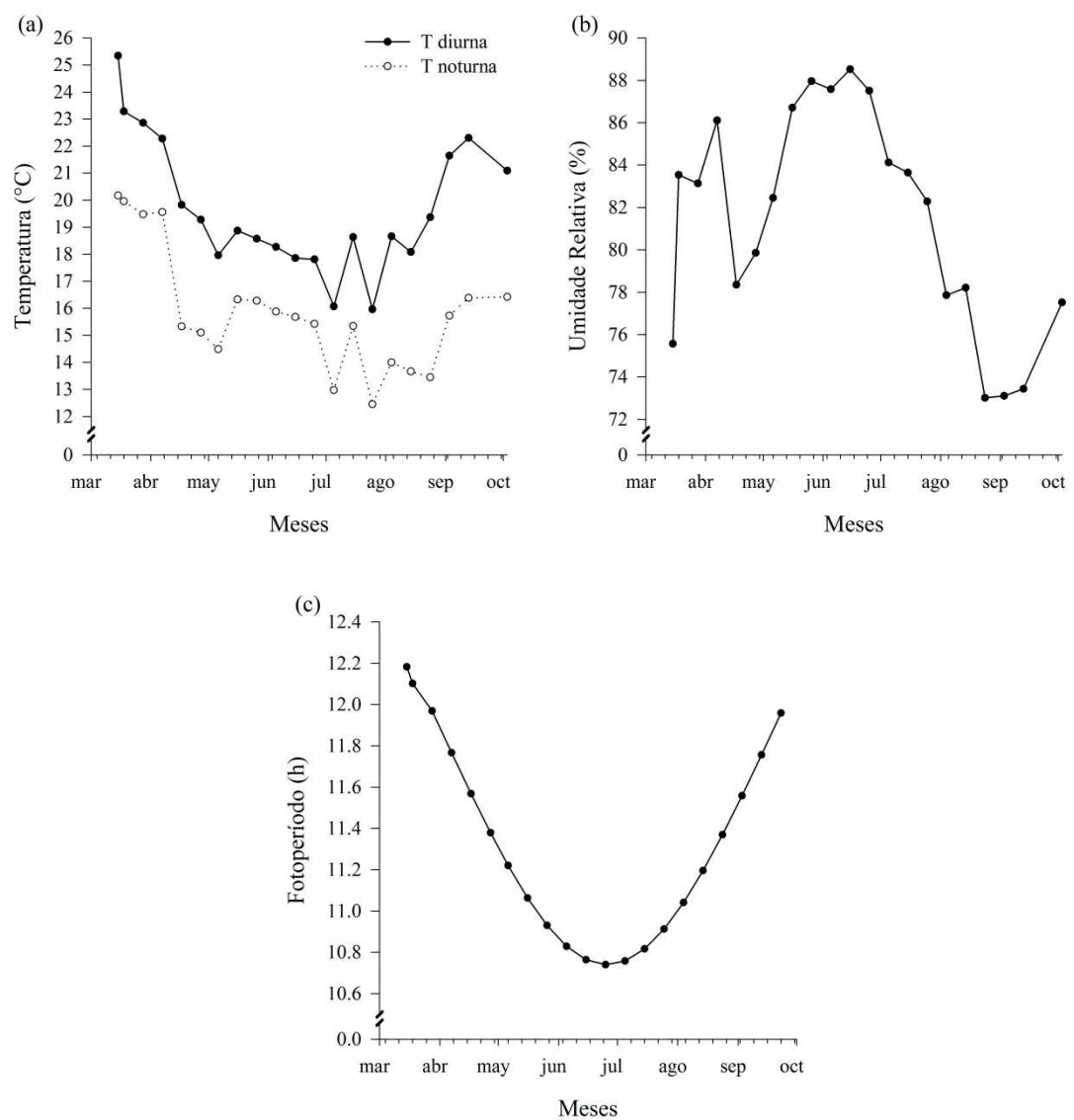


Fig. 2 Variação das temperaturas diurna e noturna (a) da umidade relativa (b) e do fotoperíodo (c) na fase reprodutiva de *E. grandiflorum*.

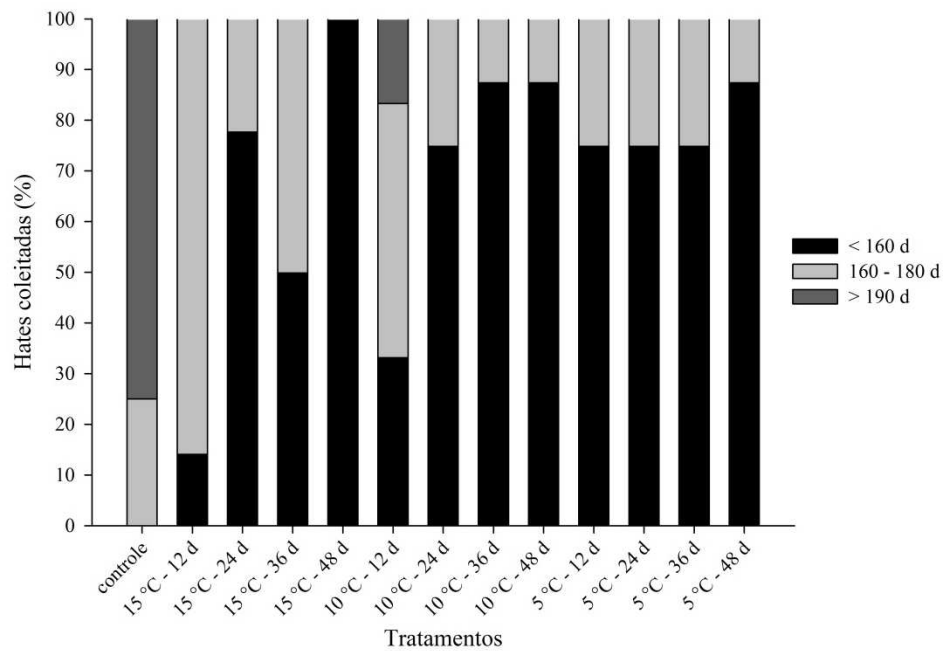


Fig. 3 Distribuição, quanto ao ciclo de cultivo, das plantas induzidas ao florescimento, em função do período e da temperatura de vernalização utilizados para sementes de *E. grandiflorum* cv. Mariachi.

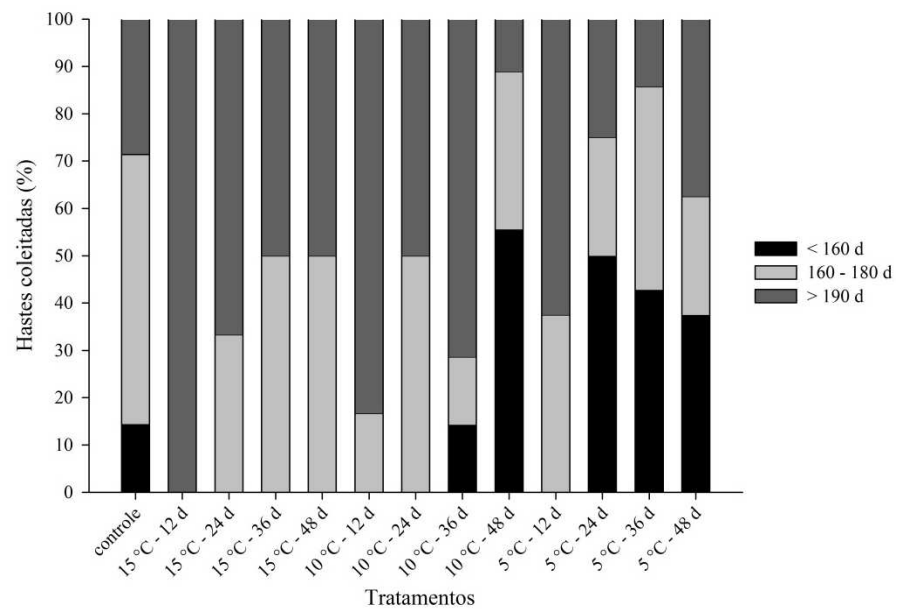


Fig. 4 Distribuição, quanto ao ciclo de cultivo, das plantas induzidas ao florescimento, em função do período e da temperatura de vernalização utilizados para sementes de *E. grandiflorum* cv. Echo.

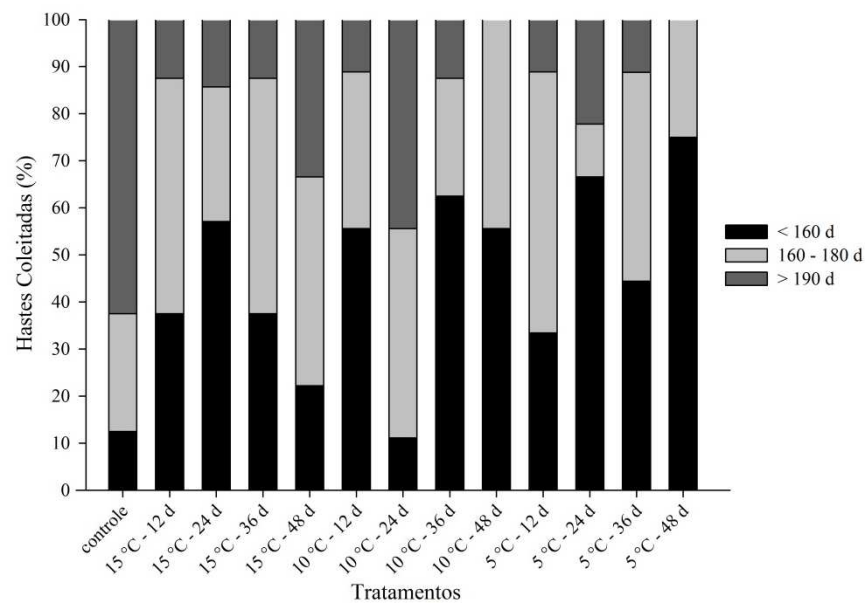


Fig. 5 Distribuição das plantas induzidas ao florescimento considerando o ciclo de cultivo em função do período e da temperatura de vernalização utilizados para sementes de *E. grandiflorum* cv. Excalibur.