EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM SOJA (*Glycine max* (L.) Merri

ÉBERSON SANCHES CALVO
Engenheiro Agrônomo

ORIENTADOR Prof. Dr. NATAL ANTONIO VELLO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de Concentração : Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Agosto 1989

C169e Calvo, Éberson Sanches
Embriogênese somática em soja (Glycine max
(L.) Merrill). Piracicaba, 1989.
146p. ilustr.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Cultura de célula vegetal 2. Soja - Cultu
ra de célula 3. Soja - Embriogênese somática 4.
Soja - Melhoramento I. Escola Superior de Agri-
cultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 633.34

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM SOJA (*Glycine max* (L.)Merrill)

ÉBERSON SANCHES CALVO
Engenheiro Agrônomo

Aprovada em : 28/08/89

Comissão julgadora:

Natal Antonio Vello

ESALQ/USP

Paulo Roberto de Camargo e Castro

ESALQ/USP

Beatriz Madalena Januzzi Mendes

CENA/USP

7-1-11/15.
Prof. Dr. NATAL ANTONIO VELLO

Orientador

AGRADECIMENTOS

Sou imensamente grato ao Corpo de Docentes e de Funcionários do Departamento de Genética /ESALQ/USP e do CENA/USP que me apoiaram em todos os sentidos durante a realização do curso de Mestrado . Além disso , gostaria de reiterar os meus agradecimentos às seguintes pessoas e instituições :

- Ao Dr. Natal Antonio Vello, pela amizade, orientação e constante interesse na minha carreira científica.
- Ao Dr. Akihiko Ando, Dr. Augusto Tulmann Neto, e Dra. Beatriz Madalena J. Mendes, da Seção de Radiogenética do CENA/USP, pelo apoio incondicional e presteza com que me receberam nos seus laboratórios.
- À Sra. Benedita Inês F. P. Rodrigues pelo auxílio nos trabalhos de laboratório e amizade.
- Aos Srs. Antonio Roberto Cogo , Claudinei Antonio Didoné e Osmair José da Silva, pelo apoio no cultivo das plantas e amizade.
- À FAPESP e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo
- O curso de Mestrado foi também para mim uma grande oportunidade de solidificar algumas amizades às quais eu manifesto os meus agradecimentos : Dario Minoru Hiromoto, Dr. Itamar Soares de Mello, Maria Helena Goldman , Anete P. de Souza, Paulo Eduardo T. de Souza, Emídio R. Bonato, Claudete P. Ruas , Arnaldo M. Pimentel, Luciano L. Naas, e aos amigos da "República".

Aos meus pais *Sebastião e Antonia*

Ao meu irmão *Edmilson*

Aos meus "tios" *Miguel e Davina*

que com muita garra e dignidade vão vencendo este
desafio que é a vida

SUMARIO

	página
ABREVIATURAS	ix.
RESUMO	x.
SUMMARY	xii.
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1. Considerações gerais	04
2.2. Fatores que influenciam a indução de embriogênese	
somática em soja	06
2.2.1. Agente solidificante e meio basal	06
2.2.2. Explante	07
2.2.3. Genótipo da planta doadora	09
2.2.4. Tipo e concentração do açúcar	10
2.2.5. Tipo e concentração de auxina	12
2.2.6. Presença de citocininas	18
2.2.7. Presença de ácido abscísico.	20
2.2.8. Fonte de nitrogênio	21
2.2.9. Vitaminas e aminoácidos	21
2.2.10. Temperatura	22
2.2.11. Luz	23
2.2.12. pH	23

2.3. Fatores que influenciam a maturação dos embriões	24
2.4. Fatores que influenciam a germinação dos embriões	27
2.5. Origem dos embriões	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1. Procedimentos gerais	31
3.1.1. Cultivo das plantas	31
3.1.2. Coleta do material, esterilização e dissecação	31
3.1.3. Preparo do meio de cultura	32
3.1.4. Condições de cultura	34
3.1.5. Avaliação das culturas na fase de indução	34
3.1.6. Avaliação das culturas na fase de maturação	36
3.2. Procedimentos específicos	36
3.2.1. Experimento 1 : efeito do 2,4-D	37
3.2.2. Experimento 2 : efeito do 2,4,5-T	37
3.2.3. Experimento 3 : efeito do NAA	37
3.2.4. Experimento 4 : efeito da sacarose e da filtração em meio contendo NAA	37
3.2.5. Experimento 5 : interação genótipo X meio de cultura	38
3.2.6. Experimento 6 : efeito da luz	38
3.2.7. Experimento 7 : efeito da suplementação com ABA, BA ou IBA	38
3.2.8. Experimento 8 : efeito da posição de	

inoculação	39
3.2.9. Experimento 9 : efeito da sacarose na presença de 2,4-D	39
3.2.10. Experimento 10 : efeito da sacarose na presença de 2,4,5-T	40
3.2.11. Experimento 11 : efeito do tipo de açúcar	40
3.2.12. Experimento 12 : efeito da L-glutamina	40
3.2.13. Experimento 13 : efeito da L-prolina	40
3.2.14. Experimento 14 : efeito de substâncias orgânicas complexas	41
3.2.15. Experimento 15 : efeito da radiação γ	41
3.2.16. Experimento 16 : determinação do meio de cultura para maturação dos embriões	42
3.2.17. Experimento 17 : efeito do genótipo e do meio de indução	42
3.2.18. Experimento 18 : efeito da luz (na matu- ração dos embriões)	43
3.2.18 Experimento 19 : efeito da radiação γ (na maturação dos embriões)	43
3.3. Observações anatômicas	43
4. RESULTADOS	46
4.1. Efeito de diferentes tipos e concentrações de auxinas	46
4.1.1. Efeito do 2,4-D (Experimento 1)	46
4.1.2. Efeito do 2,4,5-T (Experimento 2)	52
4.1.3. Efeito do NAA (Experimentos 3 e 4).....	57
4.2. Efeito do genótipo e do meio de cultura na indu- ção de embriogênese (Experimento 5)	60

4.3. Efeito da luz na indução de embriogênese	
(Experimento 6).....	64
4.4. Efeito da adição de ABA, BA, ou IBA na indu-	
ção de embriogênese (Experimento 7)	65
4.5. Efeito da posição do explante no meio de cultura	
na indução de embriogênese (Experimento 8)	65
4.6. Efeito da concentração de sacarose na indução de	
embriogênese, em meio 20D (Experimento 9)	68
4.7. Efeito da concentração de sacarose na indução de	
embriogênese, em meio 11,5T (Experimento 10)	68
4.8. Efeito do tipo de açúcar na indução de embriogênese	
(Experimento 11)	72
4.9. Efeito da suplementação com aminoácidos na indução	
de embriogênese (Experimentos 12 e 13)	72
4.10. Efeito da adição de CH, EM, ou EL na indução de	
embriogênese (Experimento 14)	76
4.11. Efeito da radiação γ na indução de embriogênese	
(Experimento 15)	78
4.12. Efeito de diferentes meios de cultura na	
maturação dos embriões (Experimento 16)	78
4.13. Efeito do genótipo e do meio de indução na	
maturação dos embriões (Experimento 17)	80
4.14. Efeito da luz na maturação dos embriões	
(Experimento 18)	83
4.15. Efeito da radiação γ na maturação dos embri-	
ões (Experimento 19)	83
4.16. Observações organográficas e anatômicas	92
5. DISCUSSÃO	102

5.1. Efeito das auxinas na indução de embriogênese	102
5.2. Anormalidades organográficas dos embrióides	105
5.3. Efeito do ABA e do BA na indução de embriogênese	111
5.4. Efeito dos demais fatores na indução de embriogênese	113
5.5. Fatores envolvidos na maturação dos embrióides	118
5.6. Origem dos embrióides	122
5.7. Estado fisiológico do explante	124
5.8. Considerações finais e perspectivas futuras	126
6. CONCLUSÕES	133
7. BIBLIOGRAFIA	135

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	Acido abscísico
2,4-D	Acido 2,4 - diclorofenóxiacético
2,4,5-T	Acido 2,4,5 - triclorofenoxiacético
IBA	Acido indolbutírico
IAA	Acido 3-indolacético
GA ₃	Acido giberélico
NAA	Acido naftalenacético
MES	Acido 2(n-morfolino) etanosulfúrico
p-CPA	Acido p-clorofenoxiacético
MCPA	Acido 2-metil-4-clorofenoxiacético
BA	Benzilaminopurina
K	Cinetina
CH	Caseína hidrolizada
EL	Extrato de levedura
EM	Extrato de malte
Zip	2-isopenteniladenina
Z	Zeatina

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill).

Autor : ÉBERSON SANCHES CALVO

Orientador : Prof. Dr. NATAL ANTONIO VELLO

RESUMO

Diversos fatores foram investigados a fim de se determinar uma metodologia para regeneração de plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) via embriogênese somática, tendo como base o germoplasma brasileiro de soja. Para isso, cotilédones imaturos foram cultivados *in vitro* sob diversas condições (regime hormonal, tipo e concentração de açúcar, etc.). Foram avaliados os parâmetros referentes à embriogênese e à calogênese, assim como observações organográficas e anatômicas.

Os resultados obtidos mostraram que as altas concentrações (10-25 mg/l) de 2,4-D ou 2,4,5-T (11,5-17,5 mg/l), interrompem a ontogênese do embrióide no estágio globular de desenvolvimento, provavelmente por assegurar o estado meristemático das células. Baixas concentrações destas auxinas promoveram um desenvolvimento precoce dos embrióides. Nessas condições os embrióides eram , na sua grande maioria, morfológicamente anormais e não puderam ser convertidos em

plântulas. A vacuolização precoce das células foi um dos eventos celulares associados a esse processo. Os embrióides tiveram origem multicelular a partir de células da epiderme e sub-epiderme do explante. A sacarose, em concentrações variando de 1,0 à 2,0 % foi o açúcar que proporcionou maior eficiência de embriogênese. O processo de indução de embriogênese foi fortemente inibido pela irradiação do explante com raios γ . A adição de L-glutamina, L-prolina, caseína hidrolizada, extrato de malte ou extrato de levedura não estimulou a indução de embriogênese. A suplementação com ABA ou BA inibiu a indução de embriogênese e não favoreceu a maturação dos embrióides. As maiores eficiências de embriogênese foram obtidas cultivando-se os explantes na posição abaxial. Tanto a indução de embriogênese quanto a maturação dos embrióides foram fortemente afetadas pelo genótipo da planta doadora do explante. Não foi evidenciada a existência de interação entre genótipo e o meio de cultura (tipo e concentração de auxina). A luz favoreceu a indução de embriogênese, sob altas concentrações de auxina, mas inibiu completamente a maturação dos embrióides. Os embrióides induzidos pelo 2,4,5-T apresentaram uma maior frequência de maturação. Com base nesses resultados foi proposto um protocolo reproduzível para regeneração de plântulas assim como um modelo de origem dos embrióides. A aplicação dessa metodologia na obtenção de somaclones e de plantas de soja transgênicas foi discutida.

SOMATIC EMBRYOGENESIS IN SOYBEAN (*Glycine max* (L.) Merrill)

Autor :ÉBERSON SANCHES CALVO

Adviser : Prof. Dr. NATAL ANTONIO VELLO

SUMMARY

Several factors were studied in order to establish a methodology for soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) plant regeneration through somatic embryogenesis, in Brazilian soybean germplasm. Immature cotyledons were cultured *in vitro*, under several conditions (type and concentrations of plant regulators, sugars, etc.). Parameters of embryogenesis, callus formation, morphological and anatomical observations were assessed qualitatively and quantitatively.

The results therein analysed showed that high concentrations (10 - 25mg/l) of 2,4-D or (11.5-17.5 mg/l) 2,4,5-T suspended embryoid ontogenesis at the globular stage, probably by maintaining the meristematic state of the cell. Low auxin concentrations promoted premature embryo development. In this condition, mostly embryoids were morphologically abnormal and could not be converted into plantlets. Early vacuolation of the cells was an event associated with this process. Somatic embryos had

multicellular origin from epidermal and sub-epidermal explant cells. Concentrations of sucrose ranging from 1.0 to 2.0 % presented the highest embryogenesis efficiency. The process of embryogenesis induction was strongly inhibited by explant gamma rays irradiation. Addition of L-glutamine, L-proline, casein hydrolysate, malt extract, or yeast extract to culture medium, did not enhance embryoid induction. Medium supplementation with ABA or BA inhibited embryogenesis induction and did not favour embryoid maturation. The highest embryogenesis efficiency was obtained culturing the explants with the abaxial surface in contact with the medium. Either embryogenesis induction and embryoid maturation was strongly influenced by the genotype of the explant donor plant. It was not found any interaction between genotype and culture medium. The presence of light favoured embryogenesis induction, under high auxin concentrations, but completely suppressed embryoid maturation. Embryoids formed by the addition of 2,4,5-T showed a high maturation frequency. Regarding these results, a reproducible procedure for plantlet regeneration was proposed, as well as a model for embryoid origin. The potential application of this methodology in the obtention of somaclones and transgenic soybean plants is discussed.

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das plantas cultivadas mais importantes, do ponto de vista sócio-econômico, para a agricultura brasileira. Isto se justifica pelo fato de que aproximadamente 65% da produção brasileira de soja é necessária para abastecer o mercado interno de óleo comestível. O restante da produção, juntamente com o farelo e a torta de soja produzidos no esmagamento para a extração do óleo, geram anualmente uma receita média de US\$ 2,5 bilhões em exportações (BONATO & BONATO, 1987). O aumento da demanda interna de óleo e da demanda externa de farelo, produto quase que insubstituível na formulação de rações animais, certamente irão assegurar à soja esta posição no mercado nacional e internacional por um bom tempo.

Os trabalhos de genética e melhoramento da soja contribuíram e vêm contribuindo intensamente para este bom desempenho da cultura (MYASAKA & MEDINA, 1981). A título de exemplo podem ser citados os trabalhos para aumento do período juvenil que permitiram que a cultura da soja se difundisse para as baixas latitudes, particularmente na região dos cerrados brasileiros (KIIHL et alii, 1984). Assim, estas pesquisas têm permitido um aumento na produção nacional de soja, através da expansão da área de plantio, sem comprometimento da produtividade, que em alguns casos chega a ser maior nas regiões de expansão do que nas regiões mais tradicionais (BONATO & BONATO, 1987).

Esta expansão na área de cultivo certamente trará

consigo a necessidade de se adaptar a cultura às novas condições de clima, solo, ao surgimento de novas doenças, etc. Por outro lado, tem sido ressaltada a necessidade de se ampliar a base genética dos cultivares brasileiros de soja a fim de se evitar possíveis patamares de produtividade, assim como contornar o problema da vulnerabilidade genética do germoplasma CHIROMOTO & VELLO, 1986).

A cultura de tecidos tem sido apontada como uma técnica capaz de auxiliar o melhoramento genético da soja (GOODMAN & KISER, 1985; ROTH et alii, 1985). Seleção *in vitro* ao nível celular, exploração da variação somaclonal e o uso da cultura de tecidos como etapa básica para a obtenção de plantas transgênicas, têm sido as aplicações mais comumente propostas.

A perspectiva de se fazer seleção *in vitro* para resistência à doenças em soja foi aberta por GRAY et alii (1986). Neste trabalho, foi demonstrado que existe correlação entre a resistência à *Phyalophora gregata* avaliada *in vitro* ao nível de calos e a resistência ao nível de plantas em casa de vegetação. Mais recentemente, também estão sendo dados os primeiros passos no sentido de se fazer seleção *in vitro* para resistência aos herbicidas (glifosato, atrazina e paraquat), para o acúmulo de aminoácidos (metionina e prolina) (AMER et alii, 1988), e para tolerância à salinidade (GHAZI et alii, 1988).

Variação somaclonal em plantas de soja foi recentemente relatada para caracteres qualitativos como deficiência de clorofila, machoesterelidade total ou parcial, e folhas enrugadas. Outras alterações fenotípicas ocorreram ao acaso (BARWALE & WIDHOLM, 1987).

A produção de plantas de soja transgênicas já foi conseguida tanto por transformação direta (com o auxílio do "revolver de genes") quanto por transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Mc CABE et alii, 1988; HINCHEE et alii, 1988). Nesse último caso foi possível introduzir, em apenas quatro meses, resistência ao herbicida glifosato, uma característica de interesse agrônômico e que foi herdada de maneira estável pela progênie, segregando na proporção esperada de 3:1 (HINCHEE et alii, 1988).

Entretanto, para que estas técnicas possam ser aplicadas com todo o seu potencial, é indispensável que se tenha uma metodologia eficiente para a regeneração de plantas *in vitro*. Existem dois processos para a regeneração de novo de plantas: embriogênese somática e organogênese. Embriogênese somática, induzida pelo tratamento de embriões zigóticos imaturos com auxinas, tem sido a forma mais frequente de regeneração de plantas de soja *in vitro* (LAZZERI et alii, 1985; RANCH et alii, 1986; GHAZI et alii, 1986; LAZZERI et alii, 1987a e 1987b; KOMATSUDA & OHYAMA, 1988; FINER & NAGASAWA, 1988).

O desenvolvimento de uma metodologia eficiente para a regeneração de plantas depende em última instância do conhecimento e domínio dos fatores que afetam o processo.

Esta pesquisa tem por objetivos (1) caracterizar, qualitativa e quantitativamente, os principais fatores que afetam o processo de embriogênese somática em soja, e (2) desenvolver um protocolo para a regeneração de plantas *in vitro* que possa servir de base para trabalhos futuros visando a obtenção de somaclones ou de plantas transgênicas, no germoplasma brasileiro de soja.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Considerações gerais

Embriogênese somática pode ser definida como o processo através do qual as células somáticas, haplóides ou diplóides, se diferenciam até formarem plantas, passando por estádios embriológicos distintos, sem que haja a fusão de gametas (WILLIAMS & MAHESWARAN, 1986). O embrião assim formado é denominado de embrião somático ou embrióide. Em algumas espécies, como p. ex. em *Citrus sinensis*, este processo ocorre naturalmente *in vivo* e é conhecido como poliembrionia. Em outras, como no caso da soja, ele é induzido, sob determinadas condições, *in vitro*.

De maneira geral, o processo de embriogênese somática pode ser dividido em três fases distintas : indução, maturação, e germinação (AMMIRATO, 1987 ; RANCH & PACE, 1988). Nas espécies estudadas até o momento, tem se observado uma grande semelhança, do ponto de vista morfológico, entre a embriogênese somática e a zigótica (com origem na fusão dos gametas), especialmente após as primeiras divisões celulares do embrião (WILLIAMS & MAHESWARAN, 1986).

A soja tem sido considerada, juntamente com outras leguminosas, uma espécie difícil de ser trabalhada *in vitro* devido a alguns insucessos iniciais na regeneração de plantas (HAMMAT et alii, 1986). Entretanto, progressos sucessivos vem sendo alcançados, particularmente nos últimos três anos, que certamente estão modificando esta imagem.

Os trabalhos com cultura de células e tecidos em soja tiveram início na década de 60, destacando-se o de GAMBORG (1968) que o levou à formulação do meio basal (macro e micro nutrientes , vitaminas) denominado de B5 e que ainda é amplamente utilizado para a cultura de células e tecidos de soja e de dezenas de outras espécies vegetais.

O primeiro relato de indução de embriogênese somática em soja foi feito por BEVERSDORF & BINGHAM (1977). Embora não tenha sido possível a regeneração de plantas, observou-se a formação de centros meristemáticos que originaram raízes ou , em alguns casos, formaram estruturas embriogênicas (embrióides muito mal diferenciados). Seis anos mais tarde foi publicado o primeiro trabalho (CHRISTIANSON et alii, 1983) mostrando ser possível a regeneração de plântulas de soja *in vitro* , via embriogênese somática. Mas foi somente em 1985 que foi publicado o primeiro protocolo, considerado pelos autores como sendo reproduzível, para a indução e regeneração de plantas por embriogênese somática em soja (LAZZERI et alii, 1985).

Diversos fatores parecem influenciar o processo de embriogênese (AMMIRATO, 1983). A exceção de LAZZERI et alii (1987a e 1987b) e PARROT et alii (1988), os trabalhos em embriogênese somática em soja são falhos no aspecto quantitativo da avaliação da influência dos diversos fatores no processo. Em muitos casos este aspecto foi completamente ignorado (BEVERSDORF & BINGHAM, 1977; CHRISTIANSON et alii, 1983; LAZZERI et alii, 1985; LI et alii, 1985; HAMMAT & DAVEY, 1987). Em outros casos a quantificação foi feita de maneira grosseira, avaliando-se apenas a percentagem de explantes que apresentaram alguma resposta, sem

se preocupar com o número e/ou com a morfologia dos embriões produzidos (LIPPMANN & LIPPMANN, 1984; RANCH et alii, 1985; GHAZI et alii, 1986; BARWALE et alii, 1986; RANCH et alii, 1986; GHAZI et alii, 1988).

A seguir serão abordadas as três fases do processo, dando-se ênfase em apresentar o que já se conhece sobre os fatores que as influenciam.

2.2. Fatores que influenciam a indução de embriogênese somática

2.2.1. Agente solidificante e meio basal

Embriogênese somática tem sido obtida usando-se tanto meio líquido quanto meio sólido ou semi-sólido (veja Tabela 1, pag. 13). O meio líquido tem sido empregado no estabelecimento de culturas embriogênicas de células em suspensão (BEVERSDORF & BINGHAN, 1977; GAMBORG et alii, 1983; CHRISTIANSON et alii, 1983 ; LI et alii, 1985; KERNS et alii, 1986; FINER & NAGASAWA, 1988). Já a grande maioria dos trabalhos, onde coincidentemente são relatados os melhores resultados na regeneração de plantas, foi usado meio solidificado com ágar em quantidades que variaram de 0,6 à 0,8% (p/v). Até o presente momento não existe nenhum estudo mostrando o efeito do tipo e da concentração do agente solidificante na indução de embriogênese somática em soja, muito embora este efeito tenha sido demonstrado em outras espécies (ZIMMERMAN & ROBACKER, 1988). O meio basal MS ou uma combinação do meio MS e B5 tem sido os mais utilizados (Tabela 1), muito embora ainda não tenha sido relatado nenhum estudo comparativo entre os diferentes meios basais.

2.2.2. Explante

O embrião zigótico imaturo tem sido o explante mais usado, embora segmentos de hipocótilo também foram utilizados no estabelecimento de cultura de células em suspensão (BEVERSDORF & BINGHAN, 1977; GAMBORG et alii, 1983; KERNS et alii, 1986) e de tecidos embriogênicos (GHAZI et alii, 1986). O eixo embrionário quando cultivado isolado do restante do embrião não apresentou resposta (RANCH et alii, 1985). Mais recentemente, FINER & NAGASAWA (1988) iniciaram uma cultura de células embriogênicas em suspensão usando calos embriogênicos obtidos de embrião zigótico imaturo em meio semi-sólido.

LIPPMANN & LIPPMANN (1984) demonstraram pela primeira vez que o estágio de desenvolvimento do explante (embrião zigótico imaturo), avaliado pelo comprimento dos cotilédones, influencia na formação de embrióides. Os autores concluíram que embriões com cotilédones com 4-5 mm de comprimento produziram um maior número de culturas embriogênicas.

LAZZERI et alii (1985) observaram que embriões zigóticos com 3-5 mm deram melhores resultados. Embriões menores tiveram baixa viabilidade em cultura e freqüentemente formavam calos do tipo friável. Embriões maiores apresentaram uma maior tendência para formação de raízes.

RANCH et alii (1985) agruparam de maneira grosseira os explantes em duas classes de tamanho e verificaram que cotilédones entre 0,5-4 mm de comprimento tinham maior freqüência de embriogênese, em todos os 14 genótipos avaliados. GHAZI et alii (1986) encontraram o valor de 6 mm como ótimo,

considerando-se apenas o número de embriões produzido por cultura. BARWALE et alii (1986) não encontraram diferenças na frequência de embriogênese em explantes com o comprimento dos cotilédones variando de 4-7mm. Portanto, embriões zigóticos com comprimento variando entre 3-6 mm parecem serem os mais promissores, de acordo com os resultados relatados acima. As diferenças encontradas podem ser compreendidas considerando-se que : o parâmetro tamanho do cotilédone não retrata de maneira fidedigna a fase de desenvolvimento do embrião; os trabalhos foram feitos com genótipos diferentes e sob condições diferentes de cultura.

Mais recentemente foi demonstrado (HAMMAT & DAVEY, 1987) que é possível se obter embriogênese, ainda que em baixas frequências, em embriões zigóticos ainda no estágio pré-cotiledonar (globular e "coração").

O único estudo existente sobre os efeitos da forma de dissecação do explante, no caso o embrião zigótico imaturo, foi feito por LAZZERI et alii (1987b). Constatou-se que a eficiência do processo (medida pela frequência de embriogênese x número médio de embriões produzido por explante cultivado) aumentou em quase seis vezes com a remoção do eixo embrionário. Também foi investigado o efeito da dissecação sobre os cotilédones, cortando-os ao meio ou em quatro partes. Ambos os tratamentos aumentaram igualmente a eficiência quando comparado com o cultivo de cotilédones inteiros. A frequência de formação de calos aumentou à medida que se fragmentou o explante. Entretanto, um resultado que chamou a atenção dos autores foi o fato de que a frequência de embriões morfológicamente normais foi

significativamente menor quando se usou cotilédones inteiros. Não foi sugerida nenhuma explicação para este fato e novos estudos devem ser feitos para confirmar estes resultados com um número maior de cultivares, ou mesmo em outros sistemas de embriogênese.

A posição do explante no meio de cultura foi recentemente apontada como um outro fator importante no processo. HARTWECK et alii (1988) demonstraram que em meio suplementado com NAA (10,0 mg/l) há uma tendência de se formar uma menor quantidade de embrióides morfológicamente normais, quando os cotilédones são colocados com a face interna em contato com o meio de cultura. Em meio suplementado com altas concentrações de 2,4-D (25,0 mg/l) houve uma maior produção de embrióides quando os cotilédones foram colocados com a face externa em contato com o meio. Em contrapartida, os embrióides produzidos nestas condições apresentaram problemas de morfologia. Resultados semelhantes, no tocante à quantidade dos embrióides produzidos, foram encontrados por COLBURN et alii (1988).

2.2.3. Genótipo da planta doadora

Até o presente momento, conseguiu-se induzir embriogênese somática em todos os genótipos testados, sob condições diversas de cultura em meio sólido (LAZZERI et alii, 1985; RANCH et alii, 1985; BARWALE et alii, 1986; KOMATSUDA & OHYAMA, 1988). Entretanto, a frequência de resposta se mostrou bastante dependente do genótipo utilizado, não só na fase de indução mas também na fase de germinação (RANCH et alii, 1985; KOMATSUDA & OHYAMA, 1988). A identificação de genótipos contrastantes quanto a frequência de embriogênese e a capacidade

de regeneração *in vitro* permitirá o estudo da genética deste caráter, tal como já foi feito para outras espécies vegetais, como p. ex. o milho (HODGES et alii, 1986). Em soja, resultados preliminares mostraram que a presença dos genótipos 'Manchu' ou 'A. K. Harrow' na genealogia confere boa capacidade embriogênica (PARROT et alii, 1988).

Não foi encontrada nenhuma correlação da capacidade embriogênica com características como grupo de maturação, ou cor do tegumento da semente (RANCH et alii, 1985; BARWALE et alii, 1986). Embora não muito clara, parece existir uma correlação positiva entre a capacidade de regeneração via organogênese em nó cotiledonar e o potencial embriogênico em cultura de células em suspensão (KERNS et alii, 1986). Essa correlação parece se refletir não só na quantidade de embriões produzidos mas também na morfologia externa desses embriões somáticos.

Já no estabelecimento de culturas de células em suspensão o efeito do genótipo do explante parece ser mais acentuado, chegando a haver genótipos com ausência completa de embriogênese. Dos 56 genótipos testados por BEVERSDORF & BINGHAM (1977), somente dois apresentaram algum potencial embriogênico.

2.2.4. Tipo e concentração do açúcar

LIPPMANN & LIPPMANN (1984) classificaram o processo de embriogênese somática em soja como sendo muito sensível a altas concentrações de açúcar no meio de cultura. Concentrações de sacarose acima de 2,0 % ou de glicose acima de 1,5 % inibiram por completo a formação de embriões, apesar de ter sido observada a formação de regiões embriogênicas até a concentração máxima

testada de 5,0 % .

LAZZERI et alii(1987b) também observaram que, tanto com sacarose quanto com glicose, a eficiência da embriogênese diminuía com o aumento da concentração do açúcar, embora os valores limites encontrados tenham diferido. No caso da sacarose a eficiência foi maior e não diferiu para as concentrações de 1,5 e 3,0 % . Já para a glicose, a maior eficiência ocorreu na concentração de 1,5 % . Em ambos os açúcares foi observada embriogênese até com 6,0 % de açúcar, vindo a se anular com 12,0 % de açúcar no meio de cultura.

Esses resultados sugerem a princípio que a embriogênese induzida por 2,4-D é mais sensível ao aumento da concentração de açúcar do que quando induzida por NAA, uma vez que LIPPMANN & LIPPMANN (1984) usaram meio suplementado com 2,4-D (1,0 mg/l) e LAZZERI et alii (1987b) usaram meio suplementado com NAA (10,0 mg/l). Entretanto, LAZZERI et alii (1987b) constataram também um efeito importante da concentração do açúcar na diferenciação do embrião somático : tanto com sacarose quanto com glicose, um aumento na concentração do açúcar levou a uma redução significativa na frequência de embriões normais. Levando-se em conta este aspecto, pode-se dizer que a concentração ótima de açúcar em meio suplementado com NAA foi de 1,5% de glicose ou sacarose.

A concentração de auxina utilizada no meio parece exercer um efeito interativo com a concentração de açúcar. RANCH et alii (1986) encontraram a concentração ótima de sacarose como sendo 6% , em meio suplementado com uma concentração maior de 2,4-D (5,0 mg/l).

No caso de culturas embriogênicas em suspensão, as concentrações de sacarose utilizadas foram sempre maiores que 2,0 % (veja Tabela 1). Nos trabalhos mais recentes tem se suplementado o meio de cultura com 6,0 % de sacarose (KERNS et alii, 1986; FINER & NAGASAWA, 1988).

Apesar da sacarose ser a fonte de carbono mais utilizada nos trabalhos de embriogênese somática em soja, evidências foram obtidas mostrando que maltose ou glicose dão maiores frequências de embriogênese que a sacarose ou mesmo a frutose (RANCH et alii, 1986). Já LAZZERI et alii (1987b) não observaram diferenças quanto ao tipo de açúcar empregado, ou seja, sacarose ou glicose.

De acordo com os resultados obtidos por RANCH et alii (1986) , não existe um efeito do genótipo ou da interação genótipo X tipo de açúcar na frequência de embriogênese. Além disso, não se observou qualquer efeito do tipo de açúcar (sacarose, frutose, glicose ou maltose) na qualidade ou morfologia externa dos embrióides produzidos.

2.2.5. Tipo e concentração de auxina

O tipo de auxina bem como as concentrações utilizadas são certamente os fatores mais importantes na indução de embriogênese somática em soja. Isto se justifica, como se verá em seguida, por se tratar de um fator que altera, de forma muito clara, tanto a frequência de resposta quanto a morfologia externa dos embrióides.

Em trabalho pioneiro com embriogênese somática no gênero *Glycine* , BEVERSDORF & BINGHAM (1977) usaram combinações de

Tabela 1. Composição dos diversos meios de cultura utilizados para a indução de embriogênese somática em soja.

Referência	Meio básico	Suplementação
BEVERSDORF & BINGHAN, 1977	MILLER (L) ¹	2,4-D (0,5) ² + K (0,5) + 2% sacarose
GAMBORG et alii, 1983	SL (L)	picloram (0,5) + 2% sacarose
CHRISTIANSON et alii, 1983 ⁴	MS (L)	2,4-D (5,0) + 2% sacarose
	CHENG (L)	IBA (0,005) + BA (0,2) + 2% sacarose + 20 mM citrato NH ₄ ⁺
LIPPMANN & LIPPMANN, 1984	L2 (S)	2,4-D (1,1) + 1% sacarose
LAZZERI et alii, 1985	MS/B5 ³ (S)	2,4-D (5,0) ou NAA (10,0), + 3% sacarose
LI et alii, 1985	MS (S)	2,4-D (0,5) + 2% sacarose
	MS (L)	IAA (0,01) + BA (0,2) + 2% sacarose
RANCH et alii, 1985	MS (S)	2,4-D (5,0) + 3% sacarose
BARWALE et alii, 1986	MS (S)	NAA (8,0) + tiamina (1,69) + ac. nicotínico (3,69) + 2% sac.
GHAZI et alii, 1986	LS (S)	2,4-D (10,0) + ABA (0,264) + 2% sacarose
RANCH et alii, 1986	MS (S)	2,4-D (5,0 - 20,0) + 3% sacarose
KERNS et alii, 1986	L2/B5 (L)	2,4-D (0,4) + 6% sacarose
HAMMAT & DAVEY, 1987	B5 (S)	IBA (0,1) + 10% água coco + 2% sacarose
LAZZERI et alii, 1987a e b	MS/B5 (S)	NAA (9,3 - 18,6) + 1,5% sacarose
KOMATSUDA & OHYAMA, 1988	MS/B5 (S)	2,4-D (2,0) ou NAA (10,0) + 3% sacarose
FINER & NAGASAWA, 1988	MS/B5 (L)	2,4-D (5,0) + L-glutamina (2,19) + 6% sacarose
PARROT et alii, 1988	MS/B5 (S)	NAA (10,0) + 1,5% sacarose, por 15 dias ⁵
OBENDORF & SLAWINSKA, 1988	MS (S)	NAA (8,0) + 3% sac. + L-glutamina (9,13), ou 2,4-D (50,0) + 6% maltose + L-glutamina (9,13)

¹ : S(sólido) e L(líquido)

² : em mg/litro

³ : macro e micro elementos do meio MS e vitaminas do meio B5

⁴ : os dois meios foram usados em sequência

⁵ : os demais trabalhos usaram um período mínimo de 30 dias de indução

2,4-D (0,0; 0,3; 0,7 e 1,0 mg/l) e IAA (0,0; 0,5 e 1,0 mg/l) em cultura de células em suspensão. Na ausência de 2,4-D não foi obtido qualquer grau de diferenciação celular. Na presença do regulador vegetal ocorreu a formação de centros meristemáticos (meristemóides) em todas as combinações de IAA testadas. Esporadicamente os meristemóides se diferenciaram em estruturas embriogênicas, em meio suplementado com 1,0 mg/l de 2,4-D.

CHRISTIANSON et alii (1983) mostraram pela primeira vez a totipotência da soja, via embriogênese somática, em cultura de células em suspensão, usando 5,0 mg/l de 2,4-D.

GAMBORG et alii (1983) obtiveram embriogênese somática, em cultura de células em suspensão, suplementando o meio com 0,2 μ M de picloram. Verificou-se também que o 2,4-D, em concentrações que variaram de 0,11 a 0,44 mg/l, substituiu perfeitamente o picloram. Entretanto, NAA, IAA ou IBA, usados nas mesmas concentrações que o 2,4-D, não levaram à formação de embrióides.

LIPPMANN & LIPPMANN (1984) avaliaram a habilidade de várias auxinas (nas concentrações de 0 - 20,0 μ M) em induzirem a formação de tecidos embriogênicos em cotilédones imaturos de soja. Os autores concluíram que tanto o 2,4-D quanto o MCPA eram auxinas adequadas. A concentração ótima de 2,4-D para a formação de embrióides foi de 1,1 mg/l, muito embora esta auxina na concentração de 0,55 mg/l proporcionou o aparecimento de uma maior quantidade de tecido potencialmente embriogênico. Quando o meio foi suplementado com outras auxinas como o NAA, IBA, 2,4,5-T ou IAA, também foi observada a formação de tecidos embriogênicos mas em frequências expressivamente menores. Para essas auxinas não se

observou a formação de embriões a partir dos tecidos meristemáticos potencialmente embriogênicos.

Por outro lado, LAZZERI et alii (1985) e LAZZERI et alii (1987a) relataram pela primeira vez a indução de embriogênese com o uso de NAA, além do 2,4-D. Segundo esses autores, o 2,4-D 5,0 mg/l permite obter altas frequências de embriogênese. Entretanto, os embriões produzidos tendem a ser morfológicamente anormais. Já o NAA produz embriões com morfologia normal, ou seja, com cotilédones definidos, eixo hipocótilo-radícula desenvolvido e presença de gema apical. Em contrapartida, a frequência de embriogênese e o número de embriões produzidos é substancialmente menor. As concentrações ótimas encontradas foram de 9,3 a 18,6 mg/l de NAA. Além da formação de embriões, as culturas mantidas em meio com NAA se diferenciavam também em raízes.

Combinações de NAA (4,7 mg/l) com 2,4-D (0,05; 0,5 e 5,0 mg/l) mostraram que, nas duas concentrações menores, o 2,4-D não exerce nenhum efeito na eficiência de embriogênese, enquanto que combinações de NAA com alta concentração de 2,4-D (5,0 mg/l) dão resultados iguais aos obtidos quando se usa somente o 2,4-D nesta mesma concentração. O 2,4-D parece ser a auxina dominante também no que se refere à morfologia externa dos embriões: concentrações tão baixas quanto 0,05 mg/l de 2,4-D reduziram a frequência de embriões normais em quase 40% em relação ao controle - NAA 9,3 mg/l - (LAZZERI et alii, 1987a). Esse efeito dominante do 2,4-D foi observado também em combinações com outros reguladores vegetais (RANCH et alii, 1986).

Resultados semelhantes foram obtidos com

experimentos de transferência entre meios de cultura com 2,4-D e NAA : as maiores frequências de embriões normais foram obtidas em meio sem 2,4-D (9,3 mg/l de NAA por 30 dias), ou quando o explante foi exposto por 1 dia em meio contendo 5,0 mg/l de 2,4-D seguido por 29 dias em meio com 9,3 mg/l NAA. Exposições mais prolongadas em meio contendo 2,4-D reduziram sensivelmente a frequência de embriões morfologicamente normais (LAZZERI et alii, 1987a).

BARWALE et alii (1986) também reportaram altas frequências de embriogênese com 2,4-D (4,4 mg/l) associadas à baixa viabilidade dos embriões. A suplementação com concentrações maiores de 2,4-D (10,0 e 14,8 mg/l) produziu um menor número de embriões. Os autores observaram, pela primeira vez, a formação de embriões em meio suplementado com IBA (8,0 mg/l) ou IAA (15,76 mg/l), ainda que em baixas frequências.

RANCH et alii (1986) , estudando o efeito de diferentes reguladores vegetais na frequência de indução de embriogênese, encontraram resultados discordantes dos expostos anteriormente. Os autores não obtiveram embriogênese e nem mesmo a formação de calos em meio de cultura suplementado com IBA ou NAA (22,6 ou 45,2 μ M), apesar dos explantes (cotilédones) terem apresentado algum crescimento durante o período de cultura.

Outro aspecto interessante deste trabalho é que pela primeira vez avaliou-se o efeito do 2,4-D em concentrações superiores a 5,0 mg/l (5,0 à 40,0 mg/l). Observou-se um efeito marcante da concentração de 2,4-D na frequência de embriogênese, sendo 10,0 e 20,0 mg/l as melhores concentrações. O aumento na concentração do 2,4-D também possibilitou uma melhora na

morfologia externa dos embrióides.

Foi relatado (RANCH et alii, 1986), também pela primeira vez, que o 2,4,5-T permite a obtenção de embriogênese em frequências iguais às obtidas com o 2,4-D. Além disso, os embrióides produzidos foram morfológicamente superiores. Culturas suplementadas com picloram, dicamba, ou p-CPA produziram tecidos embriogênicos em menor frequência. Os embrióides formados nestas condições eram todos morfológicamente anormais, independentemente da concentração de regulador vegetal empregada.

A combinação de reguladores vegetais dois a dois, resultou num abaixamento da concentração efetiva para a obtenção de embriogênese, sem comprometer a morfologia externa dos embrióides. A combinação de 2,4-D com auxinas que isoladamente foram inefetivas (NAA e IBA) aumentou tanto a frequência de embriogênese quanto a normalidade dos embrióides (RANCH et alii, 1986).

GHAZI et alii (1986) também se utilizaram de altas concentrações de 2,4-D (10,0 mg/l) para indução de embriogênese.

O efeito do tipo e da concentração de auxina na obtenção de embriogênese em cultura de células em suspensão, foi recentemente avaliado por FINER & NAGASAWA (1988). Observou-se que em baixas concentrações (0,5 e 1,0 mg/l) nenhuma das auxinas testadas (2,4-D; 2,4,5-T; picloram e dicamba) promoveu embriogênese. Nessas condições só ocorreu o crescimento e maturação de embrióides pré-existent no tecido usado como explante da cultura. Na concentração de 25,0 mg/l de 2,4-D ou 2,4,5-T não houve qualquer crescimento das culturas. Picloram e dicamba promoveram embriogênese somente em concentrações muito

altas (50,0 mg/l) e ainda assim em baixa eficiência. O 2,4-D na concentração de 5,0 mg/l foi a auxina que mais promoveu a manutenção das condições embriogênicas.

2.2.6. Presença de citocininas

A influência da suplementação com citocininas no processo de embriogênese somática em soja também tem sido investigada em diversos trabalhos, tanto em condições de cultura de células em suspensão (BEVERSDORF & BINGHAM, 1977; FINER & NAGASAWA, 1988) quanto em cultura de tecidos em meio sólido (LIPPMANN & LIPPMANN, 1984; GHAZI et alii, 1986; LAZZERI et alii, 1987a; KOMATSUDA & OHYAMA, 1988).

BEVERSDORF & BINGHAM (1977) relataram que, apesar da cinetina ter inibido a formação de meristemóides, houve um aumento na proporção desses tecidos que se diferenciaram em embrióides, quando o meio foi suplementado com 0,5 mg/l de 2,4-D e 0,1 mg/l de cinetina.

Um estudo mais detalhado foi conduzido por LIPPMANN & LIPPMANN (1984). Foram avaliados os efeitos da adição de BA, zeatina, e cinetina (0,5 à 1,0 μM) em meio contendo 1,1 mg/l de 2,4-D. Os autores concluíram que a adição de citocininas inibia sensivelmente não só a formação de tecidos embriogênicos (meristemóides) mas também a formação de embrióides. Entretanto, uma observação mais cuidadosa dos resultados, expressando-se a formação de embrióides em relação à formação de tecido embriogênico, evidencia uma superioridade na formação de embrióides quando se adicionou BA (0,1 mg/l) ao meio de cultura, muito embora este aspecto não tenha sido observado pelos autores.

GHAZI et alii (1986) não obtiveram formação de embrióides em meio de indução suplementado com BA (0,5 ou 5,0 mg/l) e 2,4-D em diversas concentrações.

LAZZERI et alii (1987a) concluíram que a indução de embriogênese somática em cotilédones imaturos de soja requer somente a presença de uma auxina, no caso o NAA. BA (0,099 mg/l) não afetou o processo, enquanto que a adição de 0,052 mg/l de BA reduziu significativamente a embriogênese e aumentou a produção de calo tipo friável. A frequência de embrióides normais não foi avaliada, impedindo assim qualquer conclusão sobre um possível efeito do BA na diferenciação dos embrióides.

Por outro lado, KOMATSUDA & OHYAMA (1988), estudando o efeito da adição de BA em meio suplementado com 10,0 mg/l de NAA, observaram que 0,1 mg/l de BA induzia uma vigorosa formação de calo tipo compacto, em detrimento da formação de embrióides. Entretanto, os embrióides formados nessas condições eram morfológicamente superiores aos embrióides formados em meio contendo somente NAA.

O efeito da adição de citocininas (BA, cinetina, ou Zip) na proliferação de culturas embriogênicas em suspensão foi avaliado por FINER & NAGASAWA (1988). Somente BA a 0,1 mg/l mostrou algum efeito estimulatório que muitas vezes foi mascarado pelo rápido crescimento de tecidos não embriogênicos, uma característica comum aos meios de cultura contendo citocinina.

Embora sem o objetivo de investigar o efeito de citocininas no processo de embriogênese somática, outros autores se utilizaram de meios de cultura contendo citocininas para obtenção de embrióides e plântulas de soja a partir de culturas de

células em suspensão (GAMBORG et alii, 1983; CHRISTIANSON et alii, 1983; LI et alii, 1985).

As citocininas parecem assim afetar a embriogênese somática em soja tanto na frequência quanto na diferenciação dos embrióides, sendo que este último efeito parece estar menos claro e necessitando de maiores estudos. Além disso, não existe ainda nenhum estudo que tenha investigado o efeito de citocininas em embriogênese induzida sob altas (>5,0 mg/l) concentrações de 2,4-D.

2.2.7. Presença de ácido abscísico

ACKERSON (1984) mostrou em sua pesquisa que o ABA exerce um papel fundamental na regulação da embriogênese *in vivo*, ou seja, na embriogênese zigótica. Este regulador vegetal tanto inibiu quanto estimulou o crescimento e o desenvolvimento do embrião zigótico, dependendo do estágio em que o mesmo se encontrava. Tais resultados estimularam a investigação de possíveis efeitos do ABA na embriogênese somática.

GHAZI et alii (1986) relataram que quando 0,264 mg/l de ABA foi usada em combinação com 10,0 mg/l de 2,4-D no meio de indução, ocorreu o aparecimento e desenvolvimento de calos embriogênicos e a formação de embrióides, tal como em meio contendo exclusivamente o 2,4-D, muito embora os autores não apresentaram dados quantitativos.

A adição de ABA (0,1 mg/l) em meio de indução contendo menores concentrações de 2,4-D (5,0 mg/l) também não alterou a eficiência do processo (LAZZERI et alii, 1987a). Entretanto, 1,0 mg/l de ABA reduziu significativamente tanto a

eficiência quanto a frequência de embriões normais. Quando o meio de indução tinha NAA (4,5 mg/l) como auxina, 0,1 mg/l de ABA foi suficiente para reduzir drasticamente a eficiência do processo. Neste último caso não foram apresentados dados sobre possíveis efeitos na morfologia externa dos embriões (LAZZERI et alii, 1987a).

2.2.8. Fonte de nitrogênio

CHRISTIANSON et alii (1983) concluíram que a substituição das fontes de nitrogênio do meio MS por 20 mM de citrato de amônio, foi um fator essencial para o estabelecimento de culturas embriogênicas de calos e posteriormente de células em suspensão.

Por outro lado, FINER & NAGASAWA (1988) encontraram um efeito tóxico do citrato de amônio (20 mM) em cultura embriogênica de células em suspensão, inibindo completamente o processo. Segundo os autores, a possível explicação para esses resultados discordantes seria que, no sistema usado por CHRISTIANSON et alii (1983) houve uma adaptação gradual ao citrato durante o estabelecimento das culturas de calos embriogênicos, uma vez que o cultivo de calos em meio sólido tem um crescimento mais lento e um contato menor do meio com o tecido.

FINER & NAGASAWA (1988) também não encontraram diferenças entre as fontes de nitrogênio do meio MS e B5 assim como a substituição destas por $10 \text{ mM } \text{NH}_4\text{NO}_3 + 30 \text{ mM } \text{KNO}_3$.

2.2.9. Vitaminas e aminoácidos

BARWALE et alii (1986) estudaram o efeito da adição

de quantidades extras de vitaminas ao meio básico MS suplementado com NAA (8,0 mg/l). Os autores verificaram que a adição de tiamina (0,4 à 1,4 mg/l) aumentou a frequência de embriogênese em pelo menos 20 %. O ácido nicotínico mostrou um efeito favorável somente na concentração de 4,0 mg/l. Piridoxina não alterou a frequência de embriogênese.

ARMSTRONG & GREEN (1985) reportaram que a adição de prolina ao meio de cultura aumentou a produção de calos friáveis e embriogênicos em milho e cenoura. Esses resultados fizeram despertar o interesse no uso de prolina e outros aminoácidos em sistemas de indução de embriogênese somática. No caso da soja, foi relatado que a adição de prolina não produziu qualquer efeito tanto na formação de embrióides em meio contendo 4,0 mg/l NAA (BARWALE et alii, 1986), quanto no crescimento de calos em meio contendo 0,5 mg/l de 2,4-D (GHAZI et alii, 1986).

Foram FINER & NAGASAWA (1988) quem fizeram pela primeira vez um estudo mais detalhado sobre o efeito da adição de aminoácidos no crescimento de culturas embriogênicas de células em suspensão. Verificou-se que os aminoácidos exerceram uma grande influência na embriogênese. Glutamina (0,73 e 1,46 mg/l) , alanina (4,45 mg/l) e asparagina (0,66 mg/l) aumentaram significativamente o crescimento das culturas. A suplementação com prolina (1,73 à 34,54mg/l), mais uma vez, não favoreceu a embriogênese.

2.2.10. Temperatura

O efeito da temperatura na indução de embriogênese somática em soja foi investigado por RANCH et alii (1986). Temperatura de 33 °C inibiu completamente o processo. Por outro

lado, não se observou diferença significativa entre as temperaturas de 20 e 28 °C.

2.2.11. Luz

Embriogênese somática em soja tem sido obtida tanto em condições de alta ou baixa intensidade luminosa, assim como na ausência completa de luz. Nesse último caso, verificou-se que a eficiência do processo foi sensivelmente reduzida (RANCH et alii, 1986; LAZZERI et alii, 1987b). RANCH et alii (1986) não encontraram diferenças entre tratamentos que envolviam diferentes condições de fotoperíodo, qualidade e intensidade luminosa. Por outro lado, LAZZERI et alii (1987b) observaram que luz tipo "Grolux" induziu embriogênese com maior frequência que luz branca, tanto em baixa ($\approx 10 \mu\text{E m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) quanto em alta ($\approx 85 \mu\text{E m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) intensidade luminosa. A formação de calos e/ou raízes ocorreu em maior frequência nos tratamentos que envolviam alta intensidade luminosa.

2.2.12. pH

LAZZERI et alii (1987b) conduziram também o único estudo existente sobre o efeito do pH do meio de cultura na embriogênese somática em soja. Os autores observaram que uma variação do pH (ajustado antes de autoclavar o meio) entre 5,0 e 7,0 não alterou a eficiência do processo. Entretanto, a frequência de embrióides normais diminuiu com o aumento do pH, sendo que pH entre 5,0 e 5,5 deram os melhores resultados. Foi observado também que o uso de tampão MES (10 mM) não afetou a viabilidade da cultura. Meio tamponado em pH 5,5 forneceu os maiores valores de

eficiência.

2.3. Fatores que influenciam a maturação dos embrióides

Também foi observado em soja que, durante o processo de embriogênese somática, os embrióides passam por estágios de desenvolvimento morfológicamente muito semelhantes aos encontrados na formação do embrião zigótico *in vivo* (BARWALE et alii, 1986; RANCH et alii, 1986; GOLDBERG, 1988). O primeiro estágio de desenvolvimento reconhecível é o globular. No estágio final um embrião maturo normal apresenta-se diferenciado em eixo hipocótilo-radícula, cotilédones e gema apical. A conversão de um embrião globular em embrião maduro é denominada de maturação (RANCH et alii, 1985; AMMIRATO, 1987).

A maioria dos protocolos publicados para a regeneração de plantas de soja, via embriogênese somática, não tratou a fase de maturação como uma fase distinta no processo. Frequentemente ela se iniciou no próprio meio de indução. Nesse caso ela se processou quase que completamente neste meio (LIPPMANN & LIPPMANN, 1984; LAZZERI et alii, 1985; LAZZERI et alii, 1987a e b), ou se completou num meio específico (KOMATSUDA & OHYAMA, 1988), ou ainda mais comumente, se completou no meio de germinação (CHRISTIANSON et alii, 1983; LI et alii, 1985; BARWALE et alii, 1986; GHAZI et alii, 1986). Normalmente, estes autores nem chegam a empregar o termo "maturação". Os meios de cultura empregados são geralmente compostos por uma auxina, preferencialmente o IBA em baixas concentrações, e uma ou mais citocininas, sendo mais frequente o uso de BA (veja Tabela 2, pag.26).

Porém, em outros casos a fase de maturação foi separada da fase de indução, sendo propostos meios específicos para a maturação dos embriões a partir do estágio globular (RANCH et alii, 1985; RANCH et alii, 1986; HAMMAT & DAVEY, 1987; BUCHHEIM et alii, 1988; OBENDORF & SLAWINSKA, 1988).

RANCH et alii (1985) empregaram pela primeira vez um meio exclusivo para a maturação dos embriões, constituído do meio B5 suplementado por IBA (0,122 mg/l). Este mesmo meio foi usado com sucesso para a maturação de embriões zigóticos *in vitro* (TILTON & RUSSELL, 1984). Após os embriões somáticos serem transferidos para este meio, ainda no estágio globular, ocorreu a maturação. Entretanto, houve uma formação precoce de raiz que só raramente foi acompanhada do aparecimento da gema apical. Esse problema foi contornado com o aumento da concentração do IBA (1,22 mg/l) ou com a adição de ABA (0,264 mg/l), sugerindo assim um efeito estimulatório do ABA, à semelhança do que ocorre na maturação do embrião zigótico *in vivo* (ACKERSON, 1984). Este mesmo meio acrescido de uma suplementação com glutamina (9,13 mg/l) foi utilizado por OBENDORF & SLAWINSKA (1988).

Posteriormente, foi proposto um meio para a maturação de embriões produzidos sob altas concentrações de 2,4-D, constituído do meio MS, 10,0% sacarose e 0,5% de carvão ativado, sem qualquer suplementação hormonal (RANCH et alii, 1986). Este mesmo meio vem sendo empregado em trabalhos mais recentes (BUCHHEIM et alii, 1988).

Esta proposta de suprimir a suplementação hormonal vem sendo adotada também para casos em que a embriogênese foi induzida por concentrações menores de 2,4-D ou mesmo com NAA

Tabela 2. Composição dos diversos meios de cultura propostos para a maturação e/ou germinação de embriões somáticos de soja.

Referência	Meio básico	Suplementação	Finalidade do meio ⁴
CHRISTIANSON et alii, 1983	CHENG (L) ¹	IBA (0,005) ² + BA (0,2) + 2% sacarose + citrato de NH ₄ ⁺	M / G
LIPPMANN & LIPPMANN, 1984	L2 (S)	Z (0,11) + 1% sacarose	G
LAZZERI et alii, 1985	MS/B5 ³ (S)	NAA (0,15) + BA, K e Z (0,033) + 3% sacarose	G
LI et alii, 1985	MS (L)	IAA (0,01) + BA (0,2) + 2% sacarose	M / G
RANCH et alii, 1985	B5 (S ou L)	IBA (0,122) + ABA (0,264) + 2% sacarose	M
	B5 ou MS (S)	IBA (0,122) + GA ₃ (0,10) + 2% sacarose	G
BARWALE et alii, 1986	MS (S)	IBA (0,041) + BA (0,38) + 3% sacarose	M / G
	OU		
	MS (S)	IBA (1,99) + BA (1,13x10 ⁻³) + GA ₃ (1,73) + 3% sac.	M / G
GHAZI et alii, 1986	LS (S)	GA ₃ (0,104) ou Z (0,110) + 2% sacarose	M / G
RANCH et alii, 1986	MS (S ou L)	0,5% carvão + 10% sacarose	M
	MS ou B5 (S)	L-prolina (5,8) + 3% sacarose	G
HAMMAT & DAVEY, 1987 ⁵	B5 (S)	IBA (0,1) + 2% sacarose	M
	1/2 B5 (S)	1,5% sac.	G
LAZZERI et alii, 1987a e b	MS/B5 (S)	NAA (9,3x10 ⁻⁵) + BA, K, Z (0,1) + 3% sacarose	G
KOMATSUDA & OHYAMA, 1988	B5 (S)	IBA (0,5) + BA (0,2) + 1% sacarose	M
	B5 (L)	1% sacarose	M
	MS/B5 (S)	NAA (0,1) + BA (0,001) + 1% sacarose	G
FINER & NAGASAWA, 1988	MS/B5 (S)	3% sacarose	M
	MS/B5 (S)	3% sacarose	G
PARROT et alii, 1988 ⁵	MS/B5 (S)	1,5% sacarose	M
	MS/B5 (S)	1,5% sacarose	G
OBENDORF & SLAWINSKA, 1988 ⁵	MS (L)	IBA (0,16) + ABA (2,64) + L-glutamina (9,13) + 3 a 21% sac., gradativamente	M
	1/2MS (S)	3% sacarose	G
BUCHHEIM et alii, 1988 ⁵	MS (S)	0,5% carvão + 10% sacarose	M
	SH (S)	1% sacarose	G

¹ : S(sólido) e L(líquido)

² : mg/l

³ : macro e micro elementos do meio MS e vitaminas do B5

⁴ : M(maturação), G(germinação), M/G (maturação se deu junto c/ germinação)

⁵ : dessecação antes da germinação

(FINER & NAGASAWA, 1988; PARROT et alii, 1988).

2.4. Fatores que influenciam a germinação dos embrióides

Germinação é a conversão dos embrióides em plântulas. Indução, maturação, e germinação são processos fisiológicos diferentes e que provavelmente requerem diferentes condições de cultura. Muitos problemas na fase de germinação surgem em função de condições inadequadas nas fases anteriores (RANCH et alii, 1985; PARROT et alii, 1988). Diversos procedimentos também foram propostos para germinar embrióides de soja (Tabela 2).

Mais uma vez, boa parte dos trabalhos não tratam esta fase como uma fase distinta no processo de regeneração. Frequentemente, tentou-se germinar embrióides ainda imaturos, dando assim uma finalidade dupla a um mesmo meio de cultura (CHRISTIANSON et alii, 1983; LI et alii, 1985; BARWALE et alii, 1986; GHAZI et alii, 1986; BARWALE et alii, 1987).

Os primeiros trabalhos sugeriram uma necessidade de citocininas para a germinação dos embrióides (LIPPMANN & LIPPMANN, 1984; LAZZERI et alii, 1985).

Entretanto, LAZZERI et alii (1987b) verificaram que a frequência de germinação foi muito pouco afetada pela variação na concentração dos reguladores vegetais (auxinas e citocininas) do meio de cultura. O aumento da concentração de citocininas só favoreceu os cotilédones a se tornarem verdes. Níveis mais elevados de auxina (NAA 0,096 mg/l) induziram a formação de calos nos embrióides. Os autores observaram que a frequência de germinação estava fortemente correlacionada com a morfologia

externa dos embrióides. Embrióides morfológicamente anormais tinham baixa frequência de germinação e levavam mais tempo para germinarem. BUCHHEIM et alii (1988) observaram que embrióides com cotilédones fundidos (em forma de colar ou de corneta) tinham frequência de germinação muito baixa.

Ainda que alguns protocolos publicados mais recentemente continuem utilizando reguladores vegetais para a germinação dos embrióides (KOMATSUDA & OHYAMA, 1988; OBENDORF & SLAVINSKA, 1988), está bem demonstrado que o processo de germinação independe da suplementação com reguladores vegetais, quando se tem embrióides perfeitamente diferenciados (CRANCH et alii, 1986; FINER & NAGASAWA, 1988; PARROT et alii, 1988; BUCHHEIM et alii, 1988). Estes resultados reforçam a importância das fases antecedentes (indução e maturação) no contexto geral do processo de regeneração de plantas de soja, via embriogênese somática.

HAMMAT & DAVEY (1987) mostraram que uma desidratação (dessecação) prévia dos embrióides, até que tivessem seu tamanho reduzido à 40-50% do seu tamanho inicial, aumenta a eficiência de germinação. Esses resultados estão em concordância com os resultados de ROSEMBERG & RINE (1986) que mostraram a necessidade de dessecação para a germinação de embriões zigóticos de soja.

Com o auxílio da dessecação, está sendo possível de se obter, para alguns genótipos, taxas de germinação de embrióides de até 100% (PARROT et alii, 1988; BUCHHEIM et alii, 1988).

2.5. Origem dos embrióides

O processo de embriogênese somática pode se dar de

duas maneiras diferentes : embriogênese direta ou embriogênese indireta (WILLIAMS & MAHESWARAN, 1986). No primeiro caso, a embriogênese ocorre em células embriogênicas pré-determinadas (PEDC) antes mesmo do cultivo *in vitro*. Os reguladores de crescimento do meio de cultura só favorecem a divisão celular e a expressão da embriogênese. Por outro lado, a embriogênese indireta requer a formação de um calo (tecido desdiferenciado). Neste caso tem-se células embriogênicamente determinadas induzidas (IEDC), e os reguladores vegetais do meio de cultura são necessários não só para que as células entrem em divisão, mas também para determinar o estado embriogênico das mesmas.

No caso da soja, resultados conflitantes tem sido relatados. LIPPMANN & LIPPMANN (1984) observaram que o desenvolvimento de embrióides a partir de cotilédones imaturos colocados em meio com 2,4-D foi precedido pelo crescimento do explante, seguido de formação de centros meristemáticos no mesófilo. Esses meristemas deram origem às saliências onde se formaram os embrióides. Também foi observada a formação de calos, principalmente nas concentrações mais altas de 2,4-D. Entretanto, os calos nunca formaram embrióides. Resultados semelhantes foram encontrados por LAZZERI et alii (1985) e KOMATSUDA & OHYAMA (1988).

Outros autores, no entanto, tem se referido às culturas como "cultura de calos embriogênicos" (RANCH et alii, 1985; GHAZI et alii, 1986). Este último observou a formação de dois tipos de calos embriogênicos : um de aparência lisa e brilhante, esverdeado e translúcido, formado em meio suplementado com 10,0 mg/l de 2,4-D; o outro de aspecto rugoso, opaco e de cor

creme, formado nos demais meios suplementados com concentrações menores de 2,4-D, com ou sem BA. Ambos os calos eram de natureza friável, mas somente os calos de natureza lisa e brilhante ("smoth-shiny") é que produziram plantas.

BARWALE et alii (1986), apesar de intitular o seu trabalho como " regeneração de plantas a partir de cultura de calos", afirma que ocorreu tanto embriogênese direta ou, em menor frequência, a formação de um calo que em seguida produziu embrióides (embriogênese indireta). Nesse trabalho utilizou-se NAA (8,0 mg/l) para a indução de embriogênese.

Um estudo mais detalhado sobre a origem dos embriões somáticos foi recentemente relatado (HARTWECK et alii, 1988). Os autores concluíram que a embriogênese não se deu pela via indireta. Em meio suplementado com NAA (10,0 mg/l), os embrióides tem origem unicelular ou, mais frequentemente , multicelular, a partir de células da epiderme ou sub-epiderme da periferia dos cotilédones. Em meio com 2,4-D (25,0 mg/l), os embrióides se originam multicelularmente, a partir de um tecido heterogêneo formado na parte central do cotilédone. Concentrações menores de 2,4-D (0,5 mg/l) propiciaram os dois tipos de comportamento.

Embriogênese somática tipicamente pela via indireta provavelmente tenha ocorrido nos casos em que se estabeleceu culturas embriogênicas de células em suspensão, a partir de calos induzidos em meio sólido (BEVERSDORF & BINGHAM, 1977; GAMBORG et alii, 1983; CHRISTIANSON et alii, 1983; LI et alii, 1985; KERNS et alii, 1986).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa foi conduzida no laboratório da Seção de Radiogenética do Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA/USP - em Piracicaba-SP, de janeiro de 1987 à julho de 1988.

3.1. Procedimentos gerais

3.1.1. Cultivo das plantas

As plantas doadoras do explante foram cultivadas em vasos plásticos em casa de vegetação. Os vasos mediam 34 x 15 cm , contendo uma mistura de terra (Latossolo roxo) com esterco de curral na proporção de 3:1. Três plantas foram cultivadas em cada vaso. Infestações de ácaros foram controladas com pulverizações semanais de Thiodan (Hoechst), e ataques de cochonilhas com Folidol (Bayer) + óleo mineral (Shell Química), seguindo essencialmente a recomendação dos fabricantes. Em plantios feitos fora da época normal de cultivo (01/10 à 15/12) usou-se lâmpadas incandescentes para assegurar um mínimo de 15 horas de fotoperíodo.

3.1.2. Coleta do material, esterilização e dissecação

O explante utilizado foi exclusivamente cotilédones obtidos de embriões imaturos. Vagens contendo embriões medindo entre 3 e 6 mm de comprimento foram coletadas das plantas cultivadas em casa de vegetação. O tamanho dos embriões foi

estimado visualizando-se as vagens contra a luz. Essas vagens tinham 15-20 dias pós - antese, variando com o genótipo da planta e com a época do plantio.

As vagens foram esterilizadas por imersão durante 20 minutos numa solução de água destilada e Q-bou (2 % de hipoclorito) na proporção de 1:1. Em seguida foram feitas duas lavagens em água destilada estéril, 10 minutos cada, a fim de se remover o excesso de hipoclorito. As vagens foram dissecadas em microscópio estereoscópico. O embrião foi isolado fazendo-se um corte com bisturi na testa da semente, próximo ao eixo embrionário, e pressionando-se a parte oposta com o auxílio de uma pinça. Os cotilédones foram separados e o eixo embrionário destacado com a ponta do bisturi. Somente os cotilédones foram cultivados. A partir da lavagem das vagens, todos os procedimentos relatados foram feitos sob condições assépticas, em câmara de fluxo laminar, conforme o protocolo publicado por LAZZERI et alii (1985).

3.1.3. Preparo do meio de cultura

O meio de cultura básico (ou basal) utilizado foi constituído de uma mistura dos sais do meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e das vitaminas do meio B5 (GAMBORG et alii, 1968), preparado a partir de soluções estoques. A composição do meio está apresentada na Tabela 3. A sacarose, na concentração de 3,0 % foi o açúcar normalmente utilizado. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. A solidificação foi feita com a adição de 0,8 % (p/v) de ágar. O meio foi distribuído nos frascos de cultura e autoclavado por 15 minutos a 120 °C/1atm. Por

Tabela 3. Composição do meio de cultura basal

Componentes	Meio de cultura	
	^a	^b
	MS mg/l	B5 mg/l
NaH_2PO_4 5	170	150
KNO_3 2	1900	2500
NH_4NO_3 1	1650	---
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	---	134
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3	440	150
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4	370	250
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	25	25
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	2
H_3BO_3	6,2	3
KI	0,83	0,75
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	10
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025
Tiamina-HCl	0,1	10
Piridoxina-HCl	0,5	1
Ac. nicotínico	0,5	1
Inositol	100	100

^a : de acordo com MURASHIGE & SKOOG (1962)

^b : de acordo com GAMBORG et alii (1968)

conveniência os meios serão referidos pela sua forma abreviada, de acordo com a suplementação de regulador vegetal e açúcar que recebeu. Assim, o meio 10A-3 representa um meio de cultura com sais do MS, vitaminas do B5, suplementado com 10,0 mg/l de NAA e 3,0 %(p/v) de sacarose. Os reguladores vegetais foram adicionados ao meio de cultura antes da autoclavagem.

3.1.4. Condições de cultura

Seis cotilédones foram cultivados, com a face externa (convexa) voltada para o meio de cultura, em cada frasco de cultura. Os frascos mediam 4,0x7,5 cm e continham 20 ml de meio de cultura. Em seguida, os frascos eram fechados com filme transparente de PVC. Cada frasco com seis cotilédones foi considerado uma repetição. As culturas foram incubadas a uma temperatura de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, sob um fotoperíodo de 16 horas. Usou-se uma mistura (1:1) de luz fluorescente branca e "Grolux" (Sylvania) com uma intensidade luminosa de aproximadamente 1000 lux.

3.1.5. Avaliação das culturas na fase de indução

Semanalmente as culturas eram inspecionadas. Ao final de 30 dias de cultivo era feita uma avaliação qualitativa e quantitativa da formação de embrióides e de calos. Os parâmetros utilizados nesta fase foram os seguintes:

- * Frequência de embriogênese : $\frac{\text{Número de cotilédones embriogênicos}}{\text{número de cotilédones cultivados (seis)}} \times 100 \%$
- * Média de embrióides produzidos por cotilédone : $\frac{\text{número total de embrióides produzido (normais + anormais)}}{\text{número de}}$

cotilédones cultivados (seis)

- * Eficiência : frequência de embriogênese x média de embrióides produzidos
- * Frequência de embrióides normais : [número de embrióides normais / número total de embrióides produzidos] x 100 %
- * Frequência de calogênese : [número de cotilédones com formação de calo / número de cotilédones cultivados (seis)] x 100 %
- * Grau de desenvolvimento (crescimento) do calo : para isso usou-se o critério de notas apresentado na Figura 1

Figura 1. Padrão de notas utilizados na avaliação do crescimento dos calos formados durante a fase de indução de embriogênese

Um cotilédone foi considerado embriogênico quando formou pelo menos um embrióide (normal ou anormal). A normalidade dos embrióides foi julgada exclusivamente pela morfologia externa dos mesmos. Assim, um embrióide foi considerado normal quando se assemelhava organograficamente a um dos estádios de desenvolvimento do embrião zigótico.

Sempre que conveniente os parâmetros frequência de embriogênese, média de embrióides produzidos e eficiência foram plotados num gráfico de escala semi-log, a fim de facilitar a comparação do desempenho dos mesmos nos diferentes experimentos.

3.1.6. Avaliação das culturas na fase de maturação

Nos experimentos de maturação dos embrióides os parâmetros avaliados foram o crescimento do calo e a frequência (%) de embrióides maduros. Um embrióide foi considerado maduro quando apresentava eixo hipocótilo-radícula e pelo menos um cotilédone definidos, assim como alguma evidência de meristema apical.

3.2. Procedimentos específicos

O efeito de diversos fatores foi avaliado suplementando-se o meio basal descrito anteriormente com os fatores apropriados ou variando-se as condições de cultura. A seguir serão relatadas estas alterações feitas em cada um dos experimentos. Os experimentos 1 ao 15 referem-se à fase de indução, enquanto que os experimentos 16 ao 19 tratam da fase de maturação.

3.2.1. Experimento 1 : efeito do 2,4-D

O meio de cultura foi suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D : 2,5 ; 5,0 ; 10,0 ; 20,0 e 25,0 mg/l, formando-se assim os meios 2,5D-3 ; 5D-3 ; 10D-3 ; 15D-3 ; 20D-3 e 25D-3, respectivamente. O cultivar utilizado foi o 'IAS-1' e cada tratamento estava repetido dez vezes.

3.2.2. Experimento 2 : efeito do 2,4,5-T

O meio de cultura foi suplementado com diferentes concentrações de 2,4,5T : 5,75 ; 11,5 e 17,5 mg/l, originando assim os meios 5,75T-3 ; 11,5T-3 e 17,5T-3 , respectivamente. O cultivar utilizado foi o 'IAS-1' , com 10 repetições.

3.2.3. Experimento 3 : efeito do NAA

O meio de cultura foi suplementado com diferentes concentrações de NAA : 5,0 ; 10,0 ; 15,0 ; 20,0 e 25,0 mg/l, formando-se assim os meios 5A-3 ; 10A-3 ; 15A-3 ; 20A-3 e 25A-3, respectivamente. O cultivar utilizado foi o 'IAS-1', com dez repetições de cada tratamento.

3.2.4. Experimento 4 : efeito da sacarose e da filtração em meio contendo NAA

O meio de cultura foi suplementado com 15,0 mg/l de NAA que foi autoclavado junto com o restante do meio de cultura ou então foi esterelizado separadamente em filtro Millipore 0,22 μ m. A sacarose foi fornecida em concentrações variáveis : 1,0 ; 1,5 ; 2,0 ; 3,0 e 6,0 % , originando-se assim os meios 15A-1 ; 15A-1,5 ; 15A-2 ; 15A-3 e 15A-6, tanto com regulador vegetal autoclavado

quanto com NAA esterelizado por filtração. O cultivar utilizado também foi o 'IAS-1', com oito repetições, constituindo um esquema fatorial com 10 tratamentos.

3.2.5. Experimento 5 : interação genótipo X meio cultura

Preparou-se os meios 2,5D-3 ; 10D-3 e 11,5T-3 , como descrito anteriormente. Para cada um desses meios foram avaliados quatro genótipos diferentes : 'IAS-1' , 'BRAGG' , 'IAC-9' e 'FT-2', constituindo-se assim um esquema fatorial com um total de 12 tratamentos. Cada tratamento foi repetido oito vezes.

3.2.6. Experimento 6 : efeito da luz

As culturas foram iniciadas nos meios de cultura 2,5D-3 e 20D-3, como descrito anteriormente, exceto que metade delas foi mantida permanentemente no escuro, originando-se assim quatro diferentes tratamentos num esquema fatorial com 10 repetições. O cultivar utilizado foi o 'IAS-1'.

3.2.7. Experimento 7 : efeito da suplementação com ABA, BA e IBA

O meio 2,5D-3 foi suplementado com diferentes combinações de ABA, BA ou IBA, formando os seguintes tratamentos : 2,5D-3 (controle 1) ; 2,5D-3 + 0,264 mg/l de ABA ; 2,5D-3 + 0,264 mg/l de ABA + 0,061 mg/l de IBA ; 2,5D-3 + 0,264 ABA, mantido no escuro ; 2,5D-3 + 0,1 mg/l de BA ; 2,5D-3 + 0,5 BA; 5D-3 + 0,264 ABA ; 5D-3 (controle 2). Em um dos tratamentos as culturas foram mantidas permanentemente no escuro. Foi incluído também um tratamento (e o respectivo controle) a fim de se verificar o

efeito do ABA em meio com maior concentração de 2,4-D (5 mg/l). Os reguladores vegetais foram autoclavados juntamente com o meio de cultura. Cada tratamento foi repetido dez vezes, e o cultivar utilizado foi o 'IAS-1'.

3.2.8. Experimento 8 : efeito da posição de inoculação

As culturas foram iniciadas nos meios de cultura 20D-3 e 11,5T-3 , preparados como descrito anteriormente. Os explantes, porém, foram colocados em duas posições diferentes em cada um dos meios de cultura, como mostra o esquema abaixo , originando-se assim um esquema fatorial com quatro tratamentos.

Na posição denominada abaxial a superfície externa (convexa) do cotilédone estava em contato com o meio de cultura, tal como nos demais experimentos. Na posição adaxial a superfície interna (plana) do cotilédone é que estava em contato com o meio de cultura. Cada tratamento foi repetido dez vezes. O cultivar utilizado foi o 'IAS-1'.

3.2.9. Experimento 9 : efeito da sacarose na presença de 2,4-D

O meio 20D foi suplementado com diferentes concentrações de sacarose : 1,0 ; 1,5 ; 2,0 ; 3,0 e 6,0 % , originando-se assim os meios 20D-1 ; 20D-1,5 ; 20D-2 ; 20D-3 e 20D-6 , respectivamente. Cada tratamento foi repetido dez vezes e

o cultivar utilizado foi o 'IAS-1'.

3.2.10. Experimento 10 : efeito da sacarose na presença de 2,4,5-T

O meio 11,5T-3 foi suplementado com diferentes concentrações de sacarose : 1,0 ; 1,5 ; 2,0 ; 3,0 e 6,0 % , originando assim os meios 11,5T-1 ; 11,5T-1,5 ; 11,5T-2 ; 11,5T-3 e 11,5T-6 , respectivamente. Cada tratamento foi repetido dez vezes e o cultivar utilizado foi o 'IAS-1'.

3.2.11. Experimento 11 : efeito do tipo de açúcar

O meio 11,5T-3 foi suplementado com diferentes tipos e concentrações de açúcares, formando os seguintes tratamentos : 11,5T-3 (controle) ; 11,5T + 1,5 % de galactose ; 11,5T + 1,5 % de glicose ; 11,5T + 3,0 % de glicose ; 11,5T + 3,0 % de maltose ; 11,5T + 1,5 % de maltose + 1,5 % de glicose. Cada tratamento foi repetido oito vezes. O cultivar utilizado foi o 'IAS-1'.

3.2.12. Experimento 12 : efeito da L- glutamina

O meio 11,5T-3 foi suplementado com três diferentes concentrações de L-glutamina : 0,0 (controle) ; 1,0 e 2,0 g/l. A glutamina foi autoclavada junto com o meio de cultura. Cada tratamento foi repetido oito vezes e o genótipo utilizado foi a PI 374 221.

3.2.13. Experimento 13 : efeito da L-prolina

Tanto o meio 11,5T-3 quanto o meio 20D-3 foram

suplementados com três diferentes concentrações de L-prolina : 0,0 (controle) ; 1,38 e 2,76 g/l , originando-se assim um esquema fatorial com seis tratamentos. A prolina foi autoclavada com o meio de cultura. Cada tratamento foi repetido oito vezes. O cultivar utilizado foi o 'IAS-1'.

3.2.14. Experimento 14 : efeito de substâncias orgânicas complexas

O meio 20D-3 foi suplementado com diferentes concentrações de caseína hidrolizada (CH), extrato de malte (EM) ou extrato de levedura (EL), formando os seguintes tratamentos : 20D-3 (controle) ; 20D-3 + 0,1 g/l de CH ; 20D-3 + 0,5 g/l de CH ; 20D-3 + 0,25 g/l de EM ; 20D-3 + 0,5 g/l de EM ; 20D-3 + 0,25 g/l de EL. Todos esses suplementos foram autoclavados junto com o restante do meio de cultura. Cada tratamento foi repetido dez vezes. O cultivar utilizado foi o 'IAS-1'.

3.2.15. Experimento 15 : efeito da radiação γ

Nesse experimento os explantes foram irradiados logo após serem dissecados. Para isso eles foram agrupados e levados num frasco contendo meio de cultura a uma fonte de ^{60}Co (radiação γ). As doses utilizadas foram de 0,0 (controle) ; 0,2 ; 0,5 ; 1,0 ; 2,0 ; 4,0 e 8,0 KR , a uma taxa de 0,3 KGy/h . Após a irradiação dos explantes eles foram colocados em novos frascos, agora cada repetição no seu frasco. O meio de cultura utilizado foi o 20D-3. Cada tratamento foi repetido oito vezes. O cultivar empregado foi o 'IAS-1'.

3.2.16. Experimento 16 : determinação do meio de cultura para maturação dos embriões

Os embriões globulares foram obtidos cultivando-se os explantes do cultivar 'IAS-1' em meio 20D-3 por 30 dias. Em seguida esses embriões (ainda ligados ao explante) foram transferidos para maturação em diferentes meios de cultura : MS + 3 % de sacarose ; MS + 5 % de sacarose ; MS + 10 % de sacarose ; MS + 3 % de sacarose + 0,5 % carvão ativado ; MS + 10 % de sacarose + 0,5 % de carvão ativado ; MS + 5 % de sacarose + 0,1 % L-glutamina ; MS + 5 % de sacarose + 0,15 % de L-prolina ; MS + 3 % de sacarose + 0,264 mg/l de ABA ; MS + 3 % de sacarose + 0,528 mg/l de ABA ; MS + 3 % de sacarose + 0,264 mg/l ABA + 0,1 % L-glutamina ; MS + 3 % de sacarose + 0,264 mg/l de ABA + 0,122 mg/l de IBA. Somente os embriões perfeitamente globulares foram transferidos. Embriões que já apresentavam algum sinal de polarização foram eliminados. Os meios de cultura foram preparados como descrito anteriormente exceto que : o meio basal utilizado foi o MS (macro e micro nutrientes, vitaminas); o ABA e o IBA foram esterilizados separadamente por filtração ; os embriões foram cultivados em placas de petri (2x10 cm). Essas culturas permaneceram no escuro, à temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. A avaliação foi feita 45 dias após a transferência.

3.2.17. Experimento 17 : efeito do genótipo e do meio de indução

Embriões globulares foram obtidos para quatro genótipos diferentes : 'IAS-1' , 'BRAGG' , 'DAVIS' e PI 374 221. Os meios de cultura utilizados para a indução de embriogênese

foram tanto o 11,5T-3 quanto o 20D-3. Após 30 dias de indução os embriões globulares foram transferidos, juntamente com o explante, para maturação em meio MS + 0,5 % de carvão ativado, em placas de petri. Essas culturas permaneceram no escuro à $25 \pm 2^\circ \text{C}$. A avaliação foi feita 45 dias após a transferência.

3.2.18. Experimento 18 : efeito da luz

Embriões globulares foram obtidos após 30 dias de indução em meio 11,5T-3. Em seguida eles foram transferidos, juntamente com o explante, para placas de petri contendo meio MS. Parte das culturas foram mantidas no escuro e a outra parte ficou sob as mesmas condições usadas na fase de indução (fotoperíodo de 16 horas). A temperatura de cultivo foi de $25 \pm 3^\circ \text{C}$ e avaliação se deu aos 45 dias após a transferência.

3.2.19. Experimento 19 : efeito da radiação γ

Os embriões globulares obtidos no experimento 15 foram transferidos, juntamente com o explante, para maturação em placas de petri contendo meio MS + 0,5 % de carvão ativado. Os embriões produzidos nas doses acima de 2,0 KR não foram transferidos devido ao baixo número de embriões obtidos nestas doses de radiação. As culturas foram mantidas no escuro à $25 \pm 2^\circ \text{C}$. A avaliação foi feita 45 dias após a transferência.

3.3. Observações anatômicas

Os cortes histológicos foram feitos em cotilédones imaturos recém coletados, em cotilédones imaturos embriogênicos, e em embriões. As soluções utilizadas estão descritas abaixo :

Fixador Carnoy

Alcool etílico	3 partes
Ácido acético glacial	1 parte

Série etanólica

Etanol nas concentrações de 10 ; 30 ; 50 ; 70 ;
80, e etanol absoluto

Série progressiva de xilol

3 partes de etanol absoluto : 1 parte de xilol
2 partes de etanol absoluto : 2 partes de xilol
1 parte de etanol absoluto : 3 partes de xilol
xilol puro

Hematoxilina férrica de Heidenhein

Mordente:

Sulfato de ferro amoniacal	2 g
Água destilada	100 ml

Corante:

Hematoxilina	1 g
Etanol absoluto	10 ml
Água destilada	q.s.p. 200 ml

Essa solução foi preparada com uma semana de
antecedência

As amostras foram fixadas em Carnoy por 24 horas.
Em seguida, foram desidratadas numa série etanólica, permanecendo

por uma hora em cada uma das soluções, exceto na solução de álcool 95 % onde se deixou as amostras por 12-24 horas. A estocagem das amostras foi feita, quando necessária, interrompendo-se a desidratação na solução de álcool 70 % e mantendo-as nessa mesma solução e em geladeira (4 C). Após a desidratação, as amostras foram embebidas progressivamente em xilol (solvente de parafina), ficando por uma hora em cada solução. Em seguida, foram colocadas em recipientes contendo xilol puro onde adicionou-se, lentamente, pequenos fragmentos de parafina até a saturação. Em cada recipiente foi então acrescentado parafina derretida, mantendo-os em estufa a 60 C por três horas. Seguiram-se duas trocas da parafina.

Após a embebição em parafina, as amostras foram emblocadas em parafina, usando-se formas de papel untadas com glicerol. Os blocos foram fixados em suporte de madeira e os cortes, com 10-12 μ m de espessura, foram feitos em micrótomo. Em seguida montou-se os cortes em lâminas de vidro para microscopia. As lâminas foram imersas sucessivamente, por 10 minutos, em xilol puro, álcool : xilol (1:1) , e pela série etanólica em ordem decrescente de concentração.

As lâminas foram então coradas em solução de hematoxilina. Isto foi feito imergindo-as na solução de mordente (por 15 minutos) , em água destilada (por 5 minutos, trocando-se a água 2 vezes) , em solução de hematoxilina (por 10 minutos), e novamente em água (5 minutos, 2 trocas) para remover o excesso do corante. As lâminas coradas foram finalmente montadas em bálsamo do Canadá e secas em estufa.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito de diferentes tipos e concentrações de auxinas na indução de embriogênese

4.1.1. Efeito do 2,4-D (Experimento 1)

Os resultados obtidos com o uso de 2,4-D como auxina indutora de embriogênese estão apresentados na Tabela 4. Pode-se notar uma certa constância na frequência de embriogênese até na concentração de 25,0 mg/l, quando houve um aumento considerável de 32 % em relação à concentração de 2,5 mg/l. Por outro lado, o número médio de embriões produzidos apresentou um aumento significativo já na concentração de 5,0 mg/l de 2,4-D. Esse aumento se refletiu, como era de se esperar, nos valores observados de eficiência. A Figura 2 deixa claro que o comportamento da eficiência foi muito mais uma função da média de embriões do que da frequência de embriogênese.

O aumento da concentração de 2,4-D produziu um efeito marcante na morfologia externa dos embriões, aumentando a frequência de embriões normais. Os embriões produzidos na menor concentração de 2,4-D (2,5 mg/l) eram, na sua maioria, relativamente grandes (>3 mm), de cor verde, opacos e organograficamente anormais. As principais anormalidades encontradas foram cotilédones fundidos, múltiplos, ou, na maioria das vezes, ausentes ou pouco desenvolvidos; eixo hipocótilo-radícula fundido, alargado, ausente ou, frequentemente,

Tabela 4. Efeito da concentração de 2,4-D na indução de embriogênese somática (cv. 'IAS-1').

Concentração 2,4-D ^a	Freq. embr. (%)	Média	Efic.	% embr. normais	Freq. calo (%)	Grau
2,5	46,67	2,964	1,383	46,99	100,0	3,05
5,0	51,85	4,679	2,426	68,70	100,0	3,44
10,0	46,67	7,786	3,633	98,62	100,0	3,65
15,0	55,00	7,303	4,017	96,68	100,0	3,95
20,0	56,67	6,088	3,450	97,59	100,0	2,75
25,0	78,33	10,53	8,250	99,59	100,0	2,30

^a : concentração de 2,4-D em mg/l

Figura 2. Representação gráfica dos parâmetros frequência de embriogênese, média de embriões produzidos e eficiência, apresentados na Tabela 4.

Figura 3. Principais tipos organográficos apresentados por embriões de soja induzidos com baixas concentrações de 2,4-D. Destaca-se: (a) embrião no estágio globular. (b) embrião com eixo hipocótilo-radícula e um cotilédone bem definido, e com início de formação de meristema apical (seta). Ambas as formas a e b ocorreram muito raramente. (c) embriões com eixo hipocótilo-radícula fundido. (d) vista superior de um embrião com cotilédones múltiplos. (e) embriões alarguecidos com cotilédones fundidos, semelhante a um vaso. (f) embrião com eixo hipocótilo-radícula definido mas com cotilédones fundidos. (g) embrião com eixo hipocótilo-radícula reduzido e alargado e dois cotilédones fundidos.

Figura 4. Cultura embriogênica de soja (cv. 'IAS-1') obtida em meio suplementado com 2,5 mg/l de 2,4-D. Podem ser vistos três embriões (e) morfológicamente anormais originando-se da borda do explante (ex).

Figura

5. Cultura embriogênica de soja (cv. 'IAS-1') obtida em meio suplementado com 5,0 mg/l de 2,4-D. Podem ser vistos diversos embriões ainda em estágio globular (g) e embriões com polarização anormal, formando precocemente os cotilédones sem a formação do eixo hipocótilo-radícula : (t) embrião anormal com três cotilédones proeminentes; (d) embrião anormal com dois cotilédones.

Figura 6. Cultura embriogênica de soja (cv. 'IAS-1') obtida em meio suplementado com 20,0 mg/l de 2,4-D. Grande quantidade de embriões perfeitamente globulares, formada na parte mais central do (explante). O calo friável típico (c) pode ser visto na periferia do explante.

pouco desenvolvido, tal como mostra a Figura 3. Os embriões classificados como organograficamente normais se assemelhavam com embriões zigóticos na fase de torpedo ou, menos frequentemente, com embriões na fase globular. Raramente foi encontrado um embrião que pudesse ser classificado como maduro.

A medida em que se aumentou a concentração de 2,4-D os embriões foram se tornando menores (≈ 1 mm), translúcidos, de cor creme a verde claro, esféricos à ovais e que foram classificados como normais por serem organograficamente idênticos a um embrião zigótico no estágio globular de desenvolvimento. Nas concentrações $\geq 10,0$ mg/l praticamente todos os embriões produzidos tinham estas características. Em meio suplementado com 5,0 mg/l de 2,4-D observou-se um comportamento intermediário, como mostram as Figuras 4, 5 e 6.

A Tabela 4 mostra ainda que não houve alteração na frequência de indução de calo, muito embora as concentrações muito altas de 2,4-D (20,0 e 25,0 mg/l) tenham provocado uma diminuição no crescimento do calo. Esse efeito pode ser visto na Figura 7. Em meio contendo 2,5 mg/l de 2,4-D, o aparecimento de embriões foi sempre precedido por um crescimento do explante, formando saliências ou protuberâncias que não se formaram nas concentrações maiores de 2,4-D (veja a Figura 7).

4.1.2. Efeito do 2,4,5-T (Experimento 2)

A Tabela 5 mostra os resultados obtidos quando se suplementou o meio de cultura com 2,4,5-T. Nas duas concentrações menores do regulador vegetal, observou-se alta frequência de embriogênese, associada a uma elevada produção de embriões.

Figura

7. Efeito da concentração de 2,4-D no desenvolvimento dos calos e do explante. Com 2,5 mg/l houve um crescimento do explante e formação de protuberâncias; o explante reteve a coloração verde. Nas concentrações de 5 , 10 e 15 mg/l de 2,4-D não houve diferenças no crescimento dos calos. Com 20 mg/l já se evidenciou uma tendência de redução no crescimento dos calos. Nesse caso o calo se desenvolveu somente na periferia do cotilédone

Porém, houve uma queda drástica tanto na frequência de embriogênese quanto na média de embrióides quando se elevou a concentração para 17,5 mg/l de 2,4,5-T. Todos os embrióides produzidos nessa condição foram considerados normais.

Tal como ocorreu com as altas concentrações de 2,4-D, houve uma grande produção de embrióides globulares. Aproximadamente 5 % dos embrióides considerados normais, na concentração de 5,75 mg/l de 2,4,5-T, já se apresentavam com cotilédones e eixo hipocótilo-radícula bem definidos. Nas concentrações superiores os embrióides considerados normais eram invariavelmente globulares, como mostra a Figura 9. A variação na concentração de 2,4,5-T não afetou a frequência de formação de calos. Os calos induzidos por 17,5 mg/l de 2,4,5-T também tiveram seu crescimento reduzido.

Embora os resultados desse experimento e do experimento anterior estejam apresentados separadamente, eles foram realizados simultaneamente, sob as mesmas condições, permitindo assim uma comparação entre os efeitos do 2,4-D e do 2,4,5-T. De modo geral, os efeitos foram muito semelhantes no aspecto qualitativo. Houve diferenças porém no fato de que, ao contrário do ocorrido com o 2,4-D, concentração muito alta de 2,4,5-T (17,5 mg/l) diminuiu drasticamente a eficiência do processo. Além disso, o 2,4,5-T apresentou uma maior tendência ($\approx 5\%$) de formação de embrióides já com cotilédones e eixo hipocótilo-radícula definidos do que o 2,4-D, nas baixas concentrações do regulador vegetal. Tanto com 2,4-D quanto com 2,4,5-T, o processo de embriogênese mostrou-se assíncronico, com embrióides sendo visíveis já a partir do décimo dia de cultura.

Tabela 5. Efeito da concentração de 2,4,5-T na indução de embriogênese somática (cv. 'IAS-1').

Concentr. 2,4,5-T ^a	Freq. embr.(%)	Média	Efic.	% embr. normais	Freq. calo(%)	Grau
5,75	61,67	7,000	4,317	84,56	100,00	3,25
11,5	65,00	9,641	6,217	88,56	100,00	3,15
17,5	20,00	3,083	0,617	100,00	100,00	2,40

a : concentração de 2,4,5-T em mg/l

Figura 8. Representação gráfica dos parâmetros frequência de embriogênese, média de embriões produzidos e eficiência, apresentados na Tabela 5.

Figura 9. Cultura embriogênica de soja (cv. 'IAS-1') obtida após 30 dias de cultivo em meio 11,5T-3. A. Vista geral mostrando a formação de um calo (c) e de um tecido (e) mais saliente nas bordas do cotilédone de onde emergiram os embrióides. B. Vista aproximada mostrando embrióides globulares típicos, um embrióide (seta 1) com início de formação de cotilédones, e (seta 2) embrióides fundidos no estágio globular.

4.1.3. Efeito do NAA (Experimento 3 e 4)

Não foi possível de se obter embriogênese em meio suplementado com NAA, nas condições descritas no experimento 3. Neste caso, no segundo dia após a inoculação do explante nos meios de cultura, já foi observada uma perda na coloração dos cotilédones (explantes). Ao final de dez dias os cotilédones estavam quase que brancos, sem qualquer sinal de crescimento, embriogênese, formação de calo, ou mesmo de necrose. Esses explantes permaneceram assim até por ocasião da avaliação final.

Duas hipóteses foram levantadas para explicar essa aparente morte do explante: uma possível degradação do NAA durante a autoclavagem do meio e/ou uma interação do NAA com a concentração de açúcar (3,0 %) do meio de cultura. O experimento 4 foi realizado com a finalidade de se testar estas hipóteses. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 6. A variação da concentração do açúcar não alterou o padrão de resposta, quando o regulador vegetal foi autoclavado. Nos meios de cultura suplementado com NAA esterilizado por filtração houve crescimento do explante, formação de calos nas bordas dos cotilédones e aparecimento de embrióides e de raízes, para todas as concentrações de açúcar. Todos os embrióides produzidos eram organograficamente anormais, como mostra a Figura 10. Na concentração de 6,0 % de sacarose houve uma forte inibição da resposta. Desta forma o NAA não foi eficiente na indução de embriogênese somática.

Tabela 6. Efeito da filtração do NAA e da concentração de açúcar na indução de embriogênese (cv. 'IAS-1').

Tratamento	Freq. de embriog. (%)	Freq. de calog. (%)	Observações
15A-1 autocl.	0,0	0,0	morte do expl.
15A-1,5 autocl.	0,0	0,0	morte do expl.
15A-2 autocl.	0,0	0,0	morte do expl.
15A-3 autocl.	0,0	0,0	morte do expl.
15A-6 autocl.	0,0	0,0	morte do expl.
15A-1 filtr.	83,7	92,0	muitas raízes
15A-1,5 filtr.	80,0	90,0	muitas raízes
15A-2 filtr.	66,6	90,0	muitas raízes
15A-3 filtr.	40,0	87,0	muitas raízes
15A-6 filtr.	5,3	53,0	poucas raízes

Figura 10. Cultura embriônica de soja (cv. 'IAS-1') obtida em meio suplementado com 15,0 mg/l de NAA esterilizado por filtração. A. Cotilédones (c) emergindo direto do explante; a seta aponta para uma gema apical em formação; observa-se também a formação de calo (ca). B. Embrião em estágio globular (g) de ocorrência rara; (p) protuberâncias formadas na borda do explante; (n) regiões necróticas; (r) raízes.

4.2. Efeito do genótipo e do meio de cultura na indução de embriogênese (Experimento 5)

Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 7 e 8. A observação das médias gerais não evidencia a existência clara de interação para qualquer um dos parâmetros avaliados. Entretanto, pode-se notar um efeito muito forte do genótipo da planta doadora do explante, principalmente na frequência de embriogênese, na eficiência, e na frequência de embriões normais. Dos genótipos avaliados, o cultivar 'IAS-1' foi superior em todos os aspectos. Independente do meio de cultura, o cultivar 'IAC-9' apresentou os piores resultados. Os cultivares 'IAS-1', 'BRAGG', e 'FT-2' tiveram um comportamento homogêneo quanto à frequência de embriões normais. Em contrapartida, o cultivar 'IAC-9' produziu, em média, uma quantidade muito baixa de embriões normais. Essa mesma tendência foi observada para o crescimento dos calos.

No que se refere ao meio de cultura, pode-se dizer que os resultados obtidos neste experimento confirmaram os obtidos em experimentos anteriores : uma superioridade das concentrações mais altas de auxina (10,0 mg/l de 2,4-D e 11,5 mg/l de 2,4,5-T) na eficiência do processo e especialmente na frequência de embriões organograficamente normais. Esses embriões eram invariavelmente globulares.

A Figura 11 sugere que o parâmetro frequência de embriogênese esteve melhor correlacionado com a eficiência, na média dos três diferentes meios de cultura.

Tabela 7. Efeitos do genótipo e do meio de cultura na frequência, média e eficiência de embriogênese somática.

GENÓTIPOS	MEIOS DE CULTURA											
	2,5D-3			10D-3			11,5T-3			MÉDIAS		
	Freq. (%)	Média	Efic.	Freq. (%)	Média	Efic.	Freq. (%)	Média	Efic.	Freq. (%)	Média	Efic.
IAS-1	46,67	3,143	1,467	66,67	6,327	4,218	81,25	4,897	3,979	64,86	4,789	3,221
BRAGG	35,19	4,052	1,426	50,00	4,089	2,041	23,81	1,600	0,381	36,33	3,247	1,283
FT-2	16,67	2,429	0,405	16,67	1,625	0,204	8,33	1,750	0,146	13,89	1,935	0,252
IAC-9	1,67	3,000	0,050	11,11	1,833	0,271	2,38	2,000	0,048	5,20	2,278	0,123
MÉDIAS	25,05	3,156	0,837	36,11	3,426	1,684	28,94	2,562	1,138

Figura 11. Representação gráfica dos parâmetros frequência de embriogênese, média de embriões produzidos e eficiência, apresentados na Tabela 7.

Tabela 8. Efeitos do genótipo e do meio de cultura na frequência de embriões normais, frequência de calogênese e grau de crescimento dos calos.

GENÓTIPOS	MEIOS DE CULTURA											
	2,5D-3			10D-3			11,5T-3			MÉDIAS		
	Embr. norm.	Freq. calo	Grau	Embr. norm.	Freq. calo	Grau	Embr. norm.	Freq. calo	Grau	Embr. norm.	Freq. calo	Grau
IAS-1	44,32	100,0	3,150	100,0	100,0	3,063	85,64	93,75	1,625	76,65	97,92	2,616
BRAGG	27,27	100,0	3,222	96,94	100,0	3,000	87,50	69,05	2,071	70,57	89,68	2,766
FT-2	23,52	100,0	2,071	76,92	95,83	2,875	85,71	85,42	1,375	62,05	93,75	2,107
IAC-9	0,00	93,33	1,700	45,46	94,44	1,833	0,00	100,0	1,286	15,15	95,92	1,606
MÉDIAS	23,78	98,33	2,523	79,83	97,57	2,693	65,21	87,05	1,560			

Tabela 9. Efeito da luz na indução de embriogênese somática, em duas diferentes concentrações de 2,4-D (cv. 'IAS-1').

Tratamento	Freq. embr.(%)	Média	Efic.	% embr. normais	Freq. calo(%)	Grau
16 h 2,5D-3	46,67	2,964	1,383	46,99	100,00	3,05
Escuro 2,5D-3	55,00	3,667	2,017	47,11	100,00	3,90
16 h 20D-3	68,33	7,561	5,167	98,71	100,00	2,30
Escuro 20D-3	51,67	4,484	2,317	91,37	98,33	3,60

Figura 12. Representação gráfica dos parâmetros frequência de embriogênese, média de embriões produzidos e eficiência, apresentados na Tabela 9.

4.3. Efeito da luz na indução de embriogênese (Experimento 6)

Os resultados obtidos neste experimento estão sumarizados na Tabela 9. Observa-se nesta Tabela que, na concentração mais baixa de 2,4-D (2,5 mg/l) houve um aumento da eficiência quando as culturas foram mantidas no escuro. O contrário ocorreu na alta concentração de 2,4-D (20,0 mg/l). Neste caso foi observada uma redução de mais de 50% na eficiência do processo. Tanto a frequência de embriões normais quanto a frequência de formação de calo aparentemente não foram influenciadas pela ausência ou presença de luz. Entretanto, houve uma tendência clara, nos dois meios de cultura, de um maior crescimento dos calos quando as culturas foram mantidas no escuro.

A Figura 12 apresenta graficamente o desempenho dos parâmetros nos diferentes tratamentos. Pode-se observar que houve uma contribuição relativamente homogênea da frequência de embriogênese e da média de embriões na eficiência.

4.4. Efeito da adição de ABA, BA, ou IBA na indução de embriogênese (Experimento 7)

O efeito da suplementação do meio de cultura com estes reguladores vegetais está apresentado na Tabela 10. Pode-se observar que a adição de ABA ou de BA reduziu sensivelmente todos os parâmetros relativos ao processo de embriogênese, inclusive a frequência de embriões normais. Mesmo a manutenção de culturas suplementadas com 0,264 mg/l de ABA no escuro não restabeleceu a frequência de embriões normais a níveis compatíveis com o do controle (sem ABA). A adição de IBA juntamente com ABA inibiu ainda mais a embriogênese. Neste tratamento houve a formação de

raízes em 60 % dos explantes. A adição de BA suprimiu por completo a embriogênese. Em meio com maior concentração de 2,4-D (5,0 mg/l) o ABA também exerceu uma redução marcante na frequência de embrióides normais (embrióides globulares).

Tanto a frequência de calogênese quanto o crescimento dos calos não foram significativamente afetados pela adição desses reguladores vegetais. Entretanto, os calos formados na presença de BA apresentaram coloração verde e eram compactos, ao contrário dos calos de coloração creme e friáveis que se formaram normalmente.

4.5. Efeito da posição do explante no meio de cultura na indução de embriogênese (Experimento 8)

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 11. Para os parâmetros frequência de embriogênese, média e eficiência, os resultados deixam claro a inexistência de interação entre a orientação do explante e o meio de cultura, para os dois meios avaliados. Independente do meio de cultura, houve uma superioridade das respostas quando se colocou a superfície externa do explante (cotilédone) em contato com o meio de cultura (posição abaxial). Entretanto, em meio 11,5T-3 houve uma tendência de se aumentar a frequência de embrióides normais com o explante na posição adaxial. O mesmo aconteceu para o crescimento dos calos no meio 20D-3.

Em meio 11,5T-3, com o explante na posição adaxial, foi observada a formação de uma espécie de "capa" (aparentemente a epiderme e sub-epiderme que resistiram ao processo de calogênese) na superfície abaxial, abaixo da qual existia um crescimento

Tabela 10. Efeito da adição de ABA, BA, ou IBA na indução de embriogênese somática, em meio suplementado com 2,4-D em baixas concentrações (cv. 'IAS-1').

Suplemen - tação(mg/l)	Freq. embr.(%)	Média	Efic.	% embr. normais ^a	Freq. calo(%)	Grau
2,5D-3 (controle)	46,67	2,964	1,383	46,99	100,00	3,05
2,5D-3 + 0,264 ABA	16,67	1,300	0,217	7,69	100,00	3,30
2,5D-3 + 0,264 ABA + 0,061 IBA	8,33	0,800	0,067	0,00	100,00	3,40
2,5D-3 + 0,264 ABA + Escuro	25,00	1,733	0,433	11,54	100,00	3,50
2,5D-3 + 0,1 BA	0,0	---	---	---	100,00	3,10
2,5D-3 + 0,5 BA	0,0	---	---	---	100,00	3,50
5D-3 + 0,264 ABA	40,0	4,250	1,700	12,75	100,00	3,25
5D-3 controle	43,0	3,970	1,700	71,00	100,00	3,30

^a: nenhum dos embriões classificados como normais tinha cotilédones e eixo hipocótilo-radícula definidos.

Tabela 11. Efeito da posição do explante no meio de cultura na indução de embriogênese somática, em dois diferentes meios de cultura (cv. 'IAS-1').

Tratamento	Freq. embr. (%)	Média	Efic.	% embr. normais	Freq. calo (%)	Grau
Abaxial 11,5T-3	27,78	4,467	1,241	61,19	100,00	2,22
Adaxial 11,5T-3	14,82	1,500	0,222	91,68	66,67	1,97
Abaxial 20D-3	60,00	3,806	2,283	87,59	100,00	1,85
Adaxial 20D-3	35,42	2,059	0,729	77,14	100,00	2,44

Figura 13. Representação gráfica dos parâmetros frequência de embriogênese, média de embriões produzidos e eficiência, apresentados na Tabela 11.

friável. Este tipo de estrutura não foi considerada como sendo um calo típico. Isto explica a menor frequência de formação de calo nesse tratamento.

A Figura 13 mostra que, mais uma vez, tanto a frequência de embriogênese quanto a média de embrióides produzidos, contribuíram de forma semelhante para o comportamento do parâmetro eficiência.

4.6. Efeito da concentração de sacarose na indução de embriogênese, em meio 20D (Experimento 9)

Os dados apresentados na Tabela 12 mostram que nas concentrações de 1,0 e 6,0 % a frequência de embriogênese foi sensivelmente reduzida, refletindo-se na eficiência. O maior valor de eficiência foi encontrado quando se suplementou o meio de cultura com 2,0 % de sacarose. A média de embrióides produzidos foi fortemente reduzida com 1,0 % de sacarose. O mesmo aconteceu com a frequência de embrióides normais.

O crescimento dos calos diminuiu com o aumento da concentração de sacarose (Figura 16). A frequência de calogênese só foi reduzida na concentração de 6,0 % de sacarose. A Figura 14 mostra que as contribuições dos parâmetros frequência de embriogênese e média de embrióides, para a eficiência do processo, foram discrepantes, especialmente nas concentrações de sacarose maiores que 2,0 %.

4.7. Efeito da concentração de sacarose na indução de embriogênese, em meio 11,5T (Experimento 10)

A Tabela 13 mostra que quando a concentração de

Tabela 12. Efeito da concentração de sacarose na indução de embriogênese somática, em meio 20D (cv. 'IAS-1').

Concentr. sacarose ^a	Freq. embr.(%)	Média	Efic.	% embr. normais	Freq. calo(%)	Grau
1,0	9,26	2,800	0,260	42,86	100,00	4,00
1,5	38,89	7,710	3,000	83,33	100,00	4,00
2,0	57,14	6,040	3,450	88,97	100,00	3,14
3,0	29,17	6,000	1,750	97,62	100,00	1,25
6,0	1,66	5,000	0,083	100,00	41,66	0,70

^a : concentração de sacarose em %

Figura 14. Representação gráfica dos parâmetros frequência de embriogênese, média de embriões produzidos e eficiência, apresentados na Tabela 12.

Tabela 13. Efeito da concentração de sacarose na indução de embriogênese somática, em meio 11,5T (cv. 'IAS-1').

Concentr. sacarose ^a	Freq. embr. (%)	Média	Efic.	% embr. normais	Freq. calo (%)	Grau
1,0	26,67	6,250	1,667	98,00	83,33	3,66
1,5	30,00	6,056	1,817	100,00	95,00	3,90
2,0	40,00	3,458	1,383	73,49	100,00	3,10
3,0	40,00	3,292	1,317	97,47	98,33	2,05
6,0	3,33	1,500	0,050	100,00	26,67	0,87

^a : concentração de sacarose em %

Figura 15. Representação gráfica dos parâmetros frequência de embriogênese, média de embriões produzidos e eficiência, apresentados na Tabela 13.

Figura 16. Efeito da concentração de sacarose (1,5 ; 2,0 ; 3,0 ; 4,0 e 6,0 %) no crescimento dos calos de soja (cv. 'IAS-1') obtidos em meio contendo 2,4-D (20,0 mg/l) ou 2,4,5-T (11,5 mg/l). De modo geral o efeito da sacarose foi semelhante para os dois hormônios, com as concentrações menores de sacarose favorecendo o crescimento dos calos. No meio com 2,4,5-T o crescimento dos calos foi proporcionalmente menor.

sacarose variou de 1,0 à 3,0 % houve uma tendência em se aumentar a frequência de embriogênese. A média de embriões produzidos, entretanto, apresentou uma tendência oposta, de maneira que a eficiência do processo não variou muito (Figura 15). Os maiores valores de eficiência foram obtidos nas concentrações de 1,0 e 1,5 % . A frequência de embriões normais tendeu a se reduzir com 2,0 % de sacarose.

O crescimento do calo foi de maneira geral inibido pelo aumento na concentração de sacarose (veja também a Figura 16). Já a frequência de formação de calo foi reduzida tanto por baixa (1,0 %) quanto por alta (6,0 %) concentração de sacarose.

4.8. Efeito do tipo e da concentração de açúcar na indução de embriogênese (Experimento 11)

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 14. Nenhum dos açúcares testados superou a eficiência obtida em meio suplementado com 3,0 % de sacarose (controle). Em meio com 1,5 % de galactose ocorreu morte dos explantes. O uso de maltose reduziu drasticamente a frequência de embriogênese, mas tendeu a aumentar a média de embriões produzidos. Somente a glicose na concentração de 3,0 % foi capaz de restabelecer a eficiência em níveis comparáveis com o do controle (meio 11,5T-3). Não houve qualquer efeito do tipo de açúcar na frequência de embriões normais.

Tanto a frequência de formação de calo quanto o grau de crescimento dos mesmos não foram afetados pelos diferentes tipos de açúcar, à exceção do meio com 3,0 % de glicose onde foi observada uma ligeira inibição destes processos.

Tabela 14. Efeito do tipo e concentração de açúcar na indução de embriogênese somática, em meio 11,5T (cv. 'IAS-1').

Tipo e conc. do açúcar	Freq. embr.(%)	Média	Efic.	% embr. normais	Freq. calo(%)	Grau
1,5 % Galactose	0,00	---	---	---	0,00	---
1,5 % Glicose	21,66	2,077	0,450	96,30	100,00	3,15
3,0 % Glicose	46,67	3,107	1,450	95,40	78,33	2,05
3,0 % Maltose	5,00	4,333	0,217	100,00	100,00	3,00
1,5 % Maltose + 1,5 % Glicose	26,67	3,250	0,867	98,08	100,00	3,00
3,0 % Sacarose (controle)	55,00	3,667	2,017	99,17	100,00	3,15

Figura 17. Representação gráfica dos parâmetros frequência de embriogênese, média de embriões produzidos e eficiência, apresentados na Tabela 14.

Tabela 15. Efeito da suplementação com L-prolina na indução de embriogênese somática, em meio 11,5T-3 e 20D-3 (cv. 'IAS-1').

Meio de cultura	Freq. embr. (%)	Média	Efic.	% embr. normais	Freq. calo (%)	Grau
11,5T-3 s/ prol.	43,75	3,238	1,417	97,06	100,00	3,38
11,5T-3 + 1,38 prol. ^a	38,54	2,595	1,000	90,63	100,00	3,00
11,5T-3 + 2,76 prol.	44,05	1,784	0,786	90,63	100,00	3,00
20D-3 s/ prol.	61,11	4,440	2,861	79,36	100,00	3,15
20D-3 + 1,38 prol.	44,79	3,256	1,458	54,29	94,79	3,06
20D-3 + 2,76 prol.	39,81	3,047	1,213	89,31	99,07	3,28

^a : em g/l

Figura 18. Representação gráfica dos parâmetros frequência de embriogênese, média de embriões produzidos e eficiência, apresentados na Tabela 15.

Tabela 16. Efeito da suplementação com L-glutamina na indução de embriogênese somática, em meio 11,5T-3 (PI 374 221).

Concentr. ^a L-glutamina	Freq. embr.(%)	Média	Efic.	% embr. normais	Freq. calo(%)	Grau
0,0	53,70	4,034	2,117	22,22	98,48	3,11
1,0	36,67	3,818	1,400	23,81	98,33	2,00
2,0	40,00	2,750	1,100	25,76	100,00	2,55

a: em g/l

Figura 19. Representação gráfica dos parâmetros frequência de embriogênese, média de embriões produzidos e eficiência, apresentados na Tabela 16.

4.9. Efeito da suplementação com aminoácidos na indução de embriogênese (Experimentos 12 e 13)

A Tabela 15 mostra os resultados obtidos para a L-prolina. Tanto em meio 11,5T-3 quanto em meio 20D-3, a suplementação com L-prolina não favoreceu a embriogênese ou mesmo a calogênese. Na verdade houve uma tendência de inibição da embriogênese pela adição de L-prolina. Concentração de 2,76 mg/l de L-prolina reduziu a eficiência em aproximadamente 50 % da obtida no meio desprovido deste aminoácido. A Figura 18 mostra que essa redução se deu principalmente pela redução do número médio de embrióides produzidos.

Resultados semelhantes foram obtidos com a adição de L-glutamina, tal como mostra a Tabela 16. Pode-se observar uma tendência da adição do aminoácido em inibir a eficiência da embriogênese. A frequência de embrióides normais não foi afetada, assim como a frequência de formação de calo. O crescimento do calo foi inibido por 1,0 mg/l L-glutamina.

4.10. Efeito da adição de CH, EM, ou EL na indução de embriogênese (Experimento 14)

Os resultados desse experimento estão apresentados na Tabela 17. Não foi observado qualquer efeito estimulatório desses compostos orgânicos na indução de embriogênese. A exceção do meio suplementado com 0,25 g/l de EM, todos os meios de cultura que receberam suplementação apresentaram uma tendência de inibir a embriogênese. Também não se observou qualquer efeito significativo desses compostos na morfologia externa dos embrióides, frequência de calogênese, ou no crescimento dos calos formados.

Tabela 17. Efeito da adição de caseína hidrolizada (CH), extrato de malte (EM), ou extrato de levedura (EL) na indução de embriogênese somática, em meio 20D-3 (cv. 'IAS-1').

Suplemen- tação(g/l)	Freq. embr.(%)	Média	Efic.	% embr. normais	Freq. calo(%)	Grau
controle	75,00	6,689	5,017	94,69	100,00	2,45
0,1 CH	76,67	5,174	3,967	95,80	100,00	2,80
0,5 CH	80,00	4,167	3,333	97,00	100,00	2,65
0,25 EM	81,67	6,531	5,333	98,44	100,00	2,90
0,5 EM	63,33	4,079	2,583	99,36	100,00	2,65
0,25 EL	68,52	3,351	2,296	91,13	100,00	2,00

Figura 20. Representação gráfica dos parâmetros frequência de embriogênese, média de embriões produzidos e eficiência, apresentados na Tabela 17.

Observando-se a Figura 20 pode-se perceber que a variação na eficiência da indução de embriogênese teve uma contribuição maior da média de embriões produzidos do que da frequência de embriogênese.

4.11. Efeito da radiação γ na indução de embriogênese

(Experimento 15)

A Tabela 18 sumariza os resultados obtidos. Pode-se notar uma queda sensível na embriogênese provocada pela irradiação do explante, mesmo nas doses mais baixas de radiação (0,2 e 0,5 KR). A frequência de embriões organograficamente normais (embriões globulares) não foi afetada por nenhuma das doses de radiação. A frequência de calogênese só foi afetada na dose mais alta (8,0 KR), enquanto que o crescimento desses calos mostrou uma tendência de redução com 4,0 KR. A medida em que se aumentou a dose de radiação foi observado um escurecimento do explante.

A Figura 21 mostra que a frequência de embriogênese e a média de embriões produzidos contribuíram de forma relativamente homogênea para a eficiência do processo.

4.12. Efeito de diferentes meios de cultura na maturação

dos embriões (Experimento 16)

Os resultados desse experimento estão sumarizados na Tabela 19. De modo geral, a frequência de embriões maduros obtida foi muito baixa. Somente a adição de carvão ativado se destacou como um fator que estimula a maturação dos embriões. Esse efeito do carvão foi inibido pela alta concentração de sacarose. Nos meios contendo carvão ativado houve um maior

Tabela 18. Efeito de diferentes doses de radiação γ na indução de embriogênese somática, em meio 20D-3 (cv. 'IAS-1').

Doses em KR	Freq. embr. (%)	Média	Efic.	% embr. normais	Freq. calo (%)	Grau
0,0	77,08	9,459	7,292	98,86	100,00	2,63
0,2	39,58	3,158	1,250	100,00	100,00	2,44
0,5	54,17	3,308	1,792	100,00	95,83	2,50
1,0	56,25	4,074	2,292	94,55	100,00	2,69
2,0	50,00	3,125	1,563	96,00	93,75	2,38
4,0	27,08	1,923	0,521	100,00	100,00	1,31
8,0	8,33	1,250	0,104	100,00	43,75	1,00

Figura 21. Representação gráfica dos parâmetros frequência de embriogênese, média de embriões produzidos e eficiência, apresentados na Tabela 18.

crescimento dos embriões e os embriões que não foram considerados maduros tinham quase sempre o formato de uma corneta, e raramente tinham indícios de formação de meristema apical, como ilustra as Figuras 22, 23 e 24. Nos demais meios de cultura os embriões tiveram muito pouco crescimento e diferenciação. A adição de carvão e/ou concentração muito alta (10,0 %) de açúcar reduziram o crescimento do calo no meio de maturação.

4.13. Efeito do genótipo e do meio de indução na maturação dos embriões (Experimento 17)

A observação da Tabela 20 permite concluir que, tanto o genótipo da planta doadora do explante quanto o meio de cultura onde foram induzidos os embriões, afetam a frequência de maturação. Não foi observada interação entre genótipo e o meio de indução. As menores frequências de maturação foram obtidas com o cultivar 'IAS-1', enquanto que os embriões produzidos em cotilédones imaturos da PI 374 221 tiveram as maiores frequências de maturação. Embriões produzidos em meio 11,5T-3 apresentaram uma maior frequência de maturação. Esses embriões quando classificados como maduro tinham eixo hipocótilo-radícula e pelo menos um cotilédone definido, assim como uma gema apical bem desenvolvida, com primórdios foliares visíveis (veja Figura 25). Já os embriões maduros induzidos em meio 20D-3 tinham qualidade inferior uma vez que o meristema apical era frequentemente pouco evidente (veja Figura 26). Esta superioridade também ocorreu com os embriões classificados como imaturos. Nesse caso os embriões induzidos em meio 20D-3 tinham o formato típico de corneta (Figura 22) ao contrário dos induzidos em meio 11,5T-3 que

Tabela 19. Desempenho de diferentes meios de cultura na maturação de embriões somáticos induzidos em meio 20D-3 (cv. 'IAS-1')

Meio de cultura	Tot. embr. transferidos	Tot. embr. maturo (%)	Formação calo	Observações
MS + 3 % sac.	142	1 (0,7%)	+++	---
MS + 5 % sac.	161	8 (5,0%)	+++	---
MS + 10 % sac.	117	4 (3,4%)	+	embriões pequenos
MS + 3 % sac. + 0,5% carvão	151	17 (11,3%)	++	embr. forma de corneta
MS + 10 % sac. + 0,5 carvão	119	3 (2,5%)	---	embr. forma de corneta
MS + 5 % sac. + 0,1% L-glutam.	119	0 (0,0%)	+++	embriões pequenos
MS + 5 % sac. + 0,15 % L-prol.	107	1 (0,9%)	+++	---
MS + 3 % sac. + 0,264 mg/l ABA	87	0 (0,0%)	+++	---
MS + 3 % sac. + 0,528 mg/l ABA	89	0 (0,0%)	+++	---
MS + 3 % sac. + 0,264 mg/l ABA + 0,1 % L-glutam.	81	1 (1,2%)	+++	---
MS + 3 % sac. + 0,264 mg/l ABA + 0,122 mg/l IBA	100	2 (2,0%)	+++	---

Tabela 20. Efeito do genótipo e do meio de indução na maturação dos embriões.

Genótipo	Meio de indução				Média
	11,5T-3		20D-3		
	N. Embr. transf.	N. Embr. mat. (%)	N. Embr. transf.	N. Embr. mat. (%)	
IAS-1	109	12 (13,0)	104	9 (8,6)	10,8
BRAGG	118	26 (22,0)	121	12 (9,9)	16,0
DAVIS	122	31 (25,4)	111	14 (12,6)	19,0
PI 374 221	139	64 (46,0)	113	28 (24,8)	35,4
Média	--	-- (26,6)	--	-- (14,0)	

eram na sua maioria embriões em pleno processo de maturação (Figura 27). Embora não tenham sido coletados dados quantitativos, os embriões do tipo mostrado na Figura 25 germinaram prontamente quando colocados em meio MS líquido, obtendo-se plântulas. Frequentemente, essas plântulas apresentaram florescimento precoce, como mostra a Figura 28. Esse processo, porém, foi facilmente revertido mantendo-se as plantas sob iluminação constante. As plantas obtidas dessa forma também maturaram normalmente.

4.14. Efeito da luz na maturação dos embriões (Experimento 18)

A Tabela 21 mostra os resultados obtidos nesse experimento. Pode-se concluir claramente que a presença de luz inibiu completamente a maturação dos embriões. Nessas condições não foi possível de se obter nenhum embrião maduro. Não houve nem mesmo crescimento dos embriões, que permaneceram invariavelmente no estágio globular.

4.15. Efeito da radiação γ na maturação dos embriões obtidos em meio 20D-3 (Experimento 19)

A Tabela 22 mostra que a radiação γ não produziu um efeito muito claro na frequência de maturação dos embriões, embora tenha havido uma tendência dos embriões obtidos em explantes irradiados terem a maturação inibida. O efeito mais claro da radiação na maturação foi observado no aspecto geral das culturas. Nas doses mais altas de radiação (0,5 e 1,0 KR) os embriões considerados imaturos eram invariavelmente pequenos,

Tabela 21. Efeito da luz na maturação dos embriões (PI 374 221).

Tratamento	N. embr. transferidos	N. embr. maturados (%)	Observações
Fotop. 16h	107	0 (0,0 %)	embriões permane- ceram globulares
Escuro	89	43 (48,0 %)	

Tabela 22. Efeito da radiação γ na maturação^a dos embriões
(cv. 'IAS-1').

Dose (KR)	N. embr. transferidos	N. embr. maturados (%)	Observações
0,0	158	8 (5,0 %)	embriões em forma de corneta
0,2	26	0 (0,0 %)	"
0,5	78	2 (2,6 %)	embriões pequenos
1,0	100	2 (2,0 %)	embriões pequenos
2,0	68	0 (0,0 %)	embriões pequenos

Figura 22. Embriões de soja (cv. 'IAS-1') induzidos em meio 20D-3 e colocados ainda no estágio globular para maturação em meio MS + 0,5 % de carvão. Vista lateral dos embriões com eixo hipocótilo-radícula definido mas apresentando cotilédones fundidos, semelhante a uma corneta. Também pode ser visto o suspensor (s) do embrião.

Figura 23. Vista superior dos embriões tipo "corneta" (cv. IAS-1') obtidos nas mesmas condições descritas na figura anterior. (a) embrião sem qualquer indício de formação de gema apical ; (b) forma menos comum onde pode-se notar (seta) a presença de um meristema apical rudimentar.

Figura 24. Embrião de soja (cv. 'IAS-1') obtido como descrito anteriormente, apresentando eixo hipocótilo-radícula (h) muito bem definido e cotilédones (c) desenvolvido mas fundidos, assemelhando-se a um guarda-chuva. É provavelmente uma evolução (por crescimento) dos embriões em forma de corneta visto nas figuras anteriores.

Figura 25. Embriões de soja (PI 374 221) normais e maduros. Os embriões globulares foram induzidos em meio 11,5T-3 e colocados para maturação em meio meio MS. Notar a presença de embriões com eixo hipocótilo-radícula (h) definido, dicotiledonar (d) ou monocotiledonar (m), assim como a presença de gema apical com primórdios foliares formados (seta).

Figura 26. Embriões de soja (PI 374 221) induzidos em meio 20D-3 e transferidos para meio de maturação MS + 0,5 % de carvão. (a) embrião maturo com eixo hipocótilo-radícula e dois cotilédones bem definidos ; (b) embrião anormal com dois cotilédones bem definidos mas com eixo hipocótilo-radícula reduzido ; (c) embriões anormais com eixo hipocótilo-radícula definido mas apresentando cotilédones fundidos.

Figura 27. Embriões de soja (PI 374 221) em processo de maturação. Os embriões foram obtidos em meio 11,5T-3 e colocados ainda no estágio globular para maturação em meio MS. (a) embrião já com eixo hipocótilo-radícula definido e com um cotilédone em formação ; (b) e (c) embriões com eixo hipocótilo-radícula definidos e dois cotilédones proeminentes; (s) suspensor.

Figura 28. Plântula de soja (cv. 'IAS-1') regenerada via embriogênese somática, apresentando florescimento precoce. A seta aponta para um botão floral.

desprovido de eixo hipocótilo-radículas e com os cotilédones fundidos. Os embriões imaturos obtidos nas doses de 0,0 e 0,2 KR eram maiores e apresentavam o formato típico (corneta) de embriões anormais obtidos em meio suplementado com alta concentração de 2,4-D (ver Figura 22).

4.16. Observações organográficas e anatômicas

Observando-se periodicamente as culturas pôde-se notar que, quando a indução foi feita em meios suplementados com concentrações de 2,4-D > 5,0 mg/l, freqüentemente os embriões pareciam emergir de um calo, como mostra a Figura 29. As culturas obtidas em meio 5D-3 mostraram um padrão intermediário, onde pôde-se ver melhor que o calo se forma a partir da face do explante que está em contato com o meio de cultura. A região de onde emergem os embriões é constituída por um tecido mais compacto e aparentemente diferenciado, assemelhando-se, como mostra a Figura 30, a um suspensor. A observação dos embriões somáticos obtidos após a maturação dos embriões globulares permite visualizar esta estrutura com maior clareza (Figura 22).

As observações anatômicas deixaram claro que o calo não está envolvido na formação do embrião, mesmo nas concentrações maiores de 2,4-D (Figuras 31 e 32).

A Figura 33 mostra que no explante, antes de ser cultivado em meio com auxina, a atividade meristemática intensa só foi detectada na camada unicelular da epiderme. Nas camadas abaixo da epiderme pôde-se observar sinais de progressão de diferenciação celular que provavelmente originarão um parênquima amilífero. Entretanto, por se tratar de tecido imaturo, ainda em

diferenciação, ele será referido genericamente de sub-epiderme.

Observou-se que os embriões tem origem multicelular a partir de 8-12 camadas de células englobando a epiderme e sub-epiderme do cotilédone. Em meio com baixa concentração de 2,4-D (2,5 mg/l) este tecido tem aparência heterogênea, sendo formado por uma mistura de células diferenciadas (vacuoladas) e células embriogênicas-meristemáticas (Figura 31). Em meio com alta concentração de 2,4-D ($\geq 10,0$ mg/l) este tecido era homogêneo, constituído exclusivamente por células embriogênicas-meristemáticas (Figura 32). Essas células apresentavam o fenótipo típico de uma célula embriogênica, com núcleo proeminente, ocupando quase toda a célula, e vacúolo muito pequeno e frequentemente não visível, sugerindo uma intensa atividade meristemática (Figuras 31 e 32).

As observações anatômicas feitas em embriões obtidos em meio 2,5D-3 indicaram uma certa descoordenação do processo de diferenciação celular. Embriões ainda em estágio globular já mostravam alta frequência de células vacuoladas e células embriogênicas distribuídas irregularmente (Figura 31). Evidências de vacuolização também foram encontradas em embriões que abortavam o desenvolvimento em estádios mais avançados, mas ainda sem a formação do eixo hipocótilo-radícula (Figura 34). Nos embriões com eixo hipocótilo-radícula bem definido pôde-se notar uma diferenciação acentuada, como mostra a Figura 35. Tentativas de germinação desses embriões resultaram na formação de estruturas aberrantes que, apesar de em alguns casos mostrarem algum grau de organização e diferenciação, nunca formaram plântulas completas (Figura 36).

Figura 29. Cultura embriogênica de soja (cv. IAS-1') obtida em meio suplementado com 10,0 mg/l de 2,4-D . Observa-se a formação, em todo o explante, de um calo friável e liso, com três embrióides globulares na parte central (seta), aparentemente originando-se do calo.

Figura 30. Corte transversal de um cotilédone embriogênico de soja (cv. 'IAS-1') obtido em meio suplementado com 5,0 mg/l de 2,4-D. Pode-se observar a formação de um calo friável (c) logo abaixo do tecido embriogênico (e) de natureza consistente ; (eb) embrióide.

Figura 31. Corte transversal de um cotilédone embriogênico (ce) de soja (cv. 'IAS-1') obtido após 20 dias de cultivo em meio 2,5D-3. Pode-se notar um embrióide globular originando-se a partir de 6-7 camadas decélulas da epiderme e sub-epiderme (seta). Este tecido é heterogêneo e apresenta células com sinais de diferenciação entremendo as células meristemáticas. Abaixo desta camada pode-se ver as células diferenciadas do parênquima do cotilédone (explante). O embrióide apresenta um padrão bastante irregular de células, mostrando desde células tipicamente meristemáticas à células bem diferenciadas (vacuoladas), assim como estágios intermediários. Veja Figura 40F.

Figura 32. Corte transversal de parte de um cotilédone embriogênico de soja (cv. 'IAS-1') obtido após 30 dias de indução em meio 10D-3. Pode-se notar um embrióide emergindo a partir de uma camada de aproximadamente 10 camadas de células tipicamente meristemáticas. Abaixo desta camada (seta) nota-se a presença de células desintegradas do calo friável que se formou na região mais interna do cotilédone. Veja Figura 40B.

Figura 33. Corte transversal de um cotilédone imaturo de soja (cv. 'IAS-1') logo após a dissecação. Pode-se notar a presença de atividade meristemática intensa somente na epiderme (seta 1). Nas camadas inferiores (sub-epiderme) pode-se observar alterações no plano de divisão celular (seta 2), com predomínio para anticlinal, indicando progressão de diferenciação. A superfície adaxial do cotilédone está voltada para cima.

Figura 34. Corte longitudinal de um embrião de soja (cv. 'IAS-1') obtido em meio 2,5D-3. Apesar do embrião mostrar evidências de início de formação de cotilédones (c) e meristema (m), pode-se notar uma região central, constituída de células vacuoladas, com nucléolo visível (seta), de formatos diferentes, intermediando dois pró-câmbios (faixa escura).

Figura 35. Corte longitudinal em eixo hipocótilo-radícula de embrião de soja (cv. 'IAS-1') induzido em meio 2,5D-3. Pode-se notar uma progressão contínua de diferenciação formando a protoderme (p), tecido fundamental (f), pró-câmbio (c) e cilindro central (i)

Figura 36. Embrióide obtido após 30 dias de indução em meio 2,5D-3 e colocado para maturação/germinação em meio MS/B5/BA, K, Z (0,033 mg/l) de acordo com LAZZERI et alii (1985). Pode-se notar a formação de calo (c) na base do embrióide, a emissão de raiz (r) e a ausência completa de cotilédones e folhas primárias, e um possível epicótilo (seta 1). Também pode ser visto (seta 2) um novo embrióide em formação (embriogênese secundária).

5. DISCUSSÃO

5.1. Efeito das auxinas na indução de embriogênese

Esta pesquisa teve início após uma tentativa frustrada de se repetir o primeiro protocolo publicado para a regeneração de plantas de soja, via embriogênese somática (LAZZERI et alii, 1985). Assim, deu-se início a uma pesquisa dos diversos fatores que sabidamente influenciam o processo de embriogênese somática (AMMIRATO, 1983a) e que conduzisse de uma forma racional a um protocolo de embriogênese somática em soja, para uso nas condições brasileiras.

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram um efeito dramático do tipo e especialmente da concentração de auxina no processo de embriogênese. Nenhum outro fator testado exerceu um efeito tão pronunciado. Esses resultados são corroborados por outros trabalhos que relatam um efeito das auxinas na frequência de resposta e na morfologia externa dos embrióides (LAZZERI et alii, 1985; RANCH et alii, 1986; LAZZERI et alii, 1987a; HARTWECK et alii, 1988).

Não se obteve, no presente estudo, embriogênese somática em meio suplementado com NAA. Uma das prováveis causas desse insucesso pode ter sido uma degradação do regulador vegetal na autoclave (Tabela 6). Entretanto, somente este fato não explica este resultado negativo, uma vez que mesmo em meio suplementado com NAA esterelizado separadamente por filtração não se formaram embrióides morfolologicamente normais. Outros autores relataram

previamente a incapacidade do NAA em formar embrióides (LIPPMANN & LIPPMANN, 1984) ou mesmo tecido potencialmente embriogênico em soja (RANCH et alii, 1986) . Em ambos os trabalhos o NAA foi autoclavado juntamente com o meio de cultura. Diferenças no genótipo das plantas utilizadas, estado fisiológico do explante, ou ainda diferença na procedência da auxina podem auxiliar na explicação desses resultados conflitantes.

A utilização do 2,4-D ou do 2,4,5-T em altas concentrações permitiu a suspensão da ontogênese no estágio globular (Tabelas 4 e 5). Esses resultados são corroborados por resultados obtidos por RANCH et alii (1986). Entretanto, ao contrário do presente estudo, estes autores não apresentaram dados quantitativos que levassem em conta o número e a frequência de embrióides morfológicamente normais . Outra constatação interessante feita no presente estudo foi que o 2,4,5-T se mostrou tão efetivo quanto o 2,4-D . Existem relatos na literatura mostrando que o 2,4,5-T não é capaz de formar embrióides em soja, tanto em meio sólido (LIPPMANN & LIPPMANN, 1984) quanto em cultura em suspensão (FINER & NAGASAWA, 1988). Somente RANCH et alii (1986) haviam empregado com sucesso o 2,4,5-T, relatando inclusive uma superioridade dessa auxina em relação ao 2,4-D, quanto à morfologia externa dos embrióides produzidos. Curiosamente o 2,4,5-T não vem sendo empregado em trabalhos posteriores de autoria do mesmo grupo (BUCHHEIM et alii, 1988; COLBURN et alii, 1988).

O aumento da concentração de 2,4-D ou 2,4,5-T provocou a paralização do desenvolvimento do embrióide no estágio globular, ou seja, suspendeu a ontogênese no estágio globular

Figura 37. Representação esquemática dos efeitos observados com as diferentes concentrações de auxinas (2,4-D e 2,4,5-T) em cotilédones imaturos de soja. A. Desenvolvimento normal dos embriões observado, muito raramente, sob baixas concentrações de auxina. Não há distinção entre as fases do processo. Essa mesma rota foi usada por outros autores em trabalhos anteriores, empregando também o NAA. B. Desenvolvimento dos embriões paralisa no estágio globular ou um pouco além. Observado frequentemente nas altas concentrações de auxina. Neste caso a maturação se processa num segundo meio de cultura (MC 2). C. Desenvolvimento dos embriões paralisa em diversos estágios, formando embriões organograficamente anormais. Frequentemente observado nas baixas concentrações de auxina.

(Figura 37). Já as baixas concentrações de auxina, especialmente de 2,4-D, parecem ter sido insuficientes para interromper a ontogênese, resultando num desenvolvimento frequentemente desorientado (precoce ?) do embrióide.

Portanto, a embriogênese somática em soja parece assumir características muito peculiares ainda na fase de indução, uma vez que dois caminhos podem ser seguidos. O primeiro seria uma indução com baixas concentrações ($\leq 5,0$ mg/l) de 2,4,5-T , 2,4-D , ou mesmo com NAA (10,0 mg/l) (LIPPMANN & LIPPMANN, 1984; LAZZERI et alii, 1985; BARWALE et alii, 1986; LAZZERI et alii, 1987a ; KOMATSUDA & OHYAMA, 1988). O segundo seria uma indução sob altas concentrações de 2,4-D ou 2,4,5-T, tal como proposto inicialmente por RANCH et alii (1986). Esta distinção não tem sido feita na literatura e isto tem gerado algumas interpretações errôneas ao se comparar resultados de diferentes trabalhos.

5.2. Anormalidades organográficas dos embrióides

Diversos tipos de anormalidades organográficas foram observadas em embrióides induzidos sob baixas (≤ 5 mg/l) concentrações de 2,4-D (Figura 3), e em menor quantidade com 2,4,5-T (5,75 mg/l). Anormalidades na morfologia externa dos embrióides têm sido constantemente relatadas também para outras espécies (CHALPERIN, 1966; AMMIRATO & STEWARD, 1971; KONAR et alii, 1972; AMMIRATO, 1985). Em soja, embrióides com cotilédones ausentes, ou pouco definidos, fundidos, com um único cotilédone; com eixo hipocótilo-radícula ausente , reduzido ou alargado , também vêm sendo encontrados. Entretanto, pouca atenção foi dada à frequência dessas anormalidades e às suas causas (LIPPMANN &

LIPPMANN, 1984; LAZZERI et alii, 1985; RANCH et alii, 1985; RANCH et alii, 1986; LAZZERI et alii, 1987a; KOMATSUDA & OHYAMA, 1988; HARTWECK et alii, 1988).

A cenoura (*Daucus carota* L.) , juntamente com outras umbelíferas, é o organismo do qual se tem as melhores informações e também em maior número, sobre os eventos organizacionais envolvidos na embriogênese somática (AMMIRATO, 1983b; AMMIRATO, 1986; AMMIRATO, 1987). No presente trabalho foram encontradas evidências, organográficas e anatômicas ,que permitem sugerir que esses eventos são muito semelhantes em soja e em cenoura.

A primeira fase do desenvolvimento é aquela que se inicia com as primeiras divisões celulares e culmina com o aparecimento do embrióide no estágio globular (Figura 38). Em cultura de células em suspensão de cenoura, uma célula ao entrar no processo de embriogênese divide-se para formar inicialmente uma estrutura denominada de pró-embrião (PE). Esta estrutura multicelular pode coordenadamente formar um embrióide globular, ou então, continuar se dividindo e formando novos PE sem perder a capacidade embriogênica. Além disso, a formação do PE a partir de uma célula é acompanhada da formação de um suspensor (KAMADA & HARADA, 1979; Mc WILLIAM et alii, 1974).

No presente trabalho, não foram encontradas evidências histológicas de origem unicelular dos embrióides. Entretanto, esta hipótese não deve ser completamente descartada. Evidências de origem unicelular foram encontradas recentemente em soja, em meio sólido suplementado com 10,0 mg/l de NAA. Também foi evidenciado nessas condições a formação de um tecido com

Figura 38. Estádios iniciais do desenvolvimento dos embriões de cenoura. O mesmo pode estar ocorrendo em soja, exceto a origem unicelular do pró-embrião (PE) A. Todos os estádios típicos pelos quais passa o PE. B. Divisões adicionais do PE antes da formação dos cotilédones e eixo hipocótilo-radícula, formando dois centros de crescimento adjacentes que originarão dois embriões fundidos na parte basal. C. A formação de mais de dois centros de crescimento origina um agregado de múltiplos embriões. D. Divisões adicionais e crescimento da parte apical num estágio mais avançado, originando embriões com dois pares de cotilédones distintos, num mesmo eixo hipocótilo-radícula. E e F. Formas observadas em soja com os embriões ainda em estágio globular. Modificado de AMMIRATO (1987).

comportamento similar ao de um PE (HARTWICK et alii, 1988). PE também podem estar ocorrendo em culturas embriogênicas em suspensão (KERN et alii, 1986; FINER & NAGASAWA, 1988). Apesar destas observações, embriogênese somática com origem unicelular ou multicelular muito provavelmente representam pequenas variações de um mesmo processo (WILLIAMS & MAHESWARAN, 1986).

No modelo proposto para cenoura, divisões adicionais do PE, antes da formação dos cotilédones e do eixo hipocótilo-radícula, levariam à formação de mais de um centro de crescimento que se desenvolveriam em dois ou mais embriões fundidos (Figura 38). No caso da soja, essas divisões celulares adicionais se dariam no grupo de células adjacentes que coordenadamente originam o embrião. Uma outra hipótese seria a formação de centros de origem confluentes ou superpostos, ainda por ocasião da definição do grupo de células que entrariam coordenadamente em embriogênese. Essas causas poderiam explicar o aparecimento dos embriões com eixo hipocótilo-radícula fundido em meio com baixas (≤ 5 mg/l) concentrações de 2,4-D (Figura 3c). Embora não tenha sido possível de se determinar o momento exato em que essas anormalidades se originam, pode-se dizer que elas ocorrem antes do estágio globular. Isto porque elas ocorreram, mesmo em condições de altas concentrações de auxinas, onde se formaram predominantemente embriões globulares (Figura 9).

A segunda fase engloba a fase de maturação do embrião, ou seja, a formação dos primórdios cotiledonares, o seu crescimento, a diferenciação celular iniciando a formação dos tecidos, e a formação dos meristemas apical e radicular.

Figura 39. Anormalidades observadas em cotilédones de embriões de cenoura, decorrentes de alterações no tamanho do meristema e/ou do prolongamento das divisões celulares após a formação dos primórdios cotiledonares. Na embriogênese normal o pró-embrião (A) cresce através de divisões celulares e eventualmente um "anel" aparece na parte apical (B) de onde emergem os primórdios que crescem para formar os dois cotilédones separados (C). No embrião maduro a gema apical se localiza entre os dois cotilédones (D). A continuação das divisões celulares entre os dois cotilédones resultaria em cotilédones fundidos (E). O prolongamento das divisões antes da formação do anel originaria mais de dois centros (F) meristemáticos (primórdios) e cotilédones múltiplos (G). Um prolongamento maior das divisões resultaria em cotilédones fundidos (H). A ocorrência de poucas divisões celulares no pró-embrião formaria um anel de crescimento meristemático menor, com um único primórdio cotiledonar (I) e portanto um único cotilédone (K) que também pode estar fundido (J). Vacuolização prematura das células (L), com ou sem prolongamento nas divisões celulares também pode aumentar o anel cotiledonar. Esses mesmos eventos podem estar ocorrendo em embriões de soja. Adaptado de AMMIRATO (1987).

Entretanto, alguns destes eventos podem ser prematuro, atrasado, ausente, ou prolongado no tempo, alterando assim a sequência normal do desenvolvimento : divisão celular, crescimento e diferenciação (AMMIRATO, 1987).

Diversas anormalidades foram encontradas, no presente estudo, na formação dos cotilédones dos embriões (Figura 3). Essas mesmas anormalidades foram relatadas em embriões de cenoura, decorrentes de anormalidades na formação dos centros de crescimento meristemáticos no estágio globular, que posteriormente originarão os primórdios cotiledonares (Figura 39).

O prolongamento das divisões celulares no tempo levaria à formação de cotilédones fundidos (Figuras 3g e 39E). Se isto ocorrer antes mesmo da definição dos centros meristemáticos, então irão surgir os embriões com cotilédones múltiplos (Figuras 3d e 39G), ou com cotilédones inteiramente fundidos (Figuras 3e e 39H). Analogamente, a redução nas divisões celulares levaria à formação de um único cotilédone (Figuras 3b e 39J). Uma vacuolização prematura das células também provocaria uma expansão nesses centros meristemáticos, tal como mostra a Figura 39L. No presente trabalho foram encontradas diversas evidências histológicas de vacuolização precoce em embriões produzidos sob baixas concentrações de 2,4-D (Figuras 31 e 34).

A observação anatômica de embriões que mostraram desenvolvimento acentuado do eixo hipocótilo-radícula, sem no entanto o desenvolvimento dos cotilédones e do meristema apical, revelou uma diferenciação histológica prematura (Figura 35), quando comparada com um embrião maduro normal. Nesse caso, detecta-se claramente um feixe de células meristemáticas ao longo

da região central do eixo hipocótilo-radícula (pró-câmbio, precursor do sistema vascular), que se bifurca na altura dos cotilédones (HARTWECK et alii, 1988). A expansão precoce do eixo hipocótilo-radícula, formando embrióides organograficamente semelhantes aos da Figura 3, também tem sido apontada por outros autores como causa de anormalidades em embrióides (CHÉE & CANTLIFFE, 1988).

5.3. Efeito do ABA e do BA na indução de embriogênese

Uma vez identificadas as anormalidades nos embrióides, o próximo passo seria controlá-las. Diversos componentes do meio de cultura afetam o processo de embriogênese (AMMIRATO, 1983b; RANCH & PACE, 1988). Foi tentada a adição de BA (uma citocinina) e de ABA no meio de indução, afim de se melhorar a morfologia externa dos embrióides produzidos sob baixas concentrações de 2,4-D (Tabela 10). A redução observada na frequência de embriogênese e no número de embrióides era, até certo ponto, esperada. O ABA tem ação antagônica à ação das auxinas (BIDWELL, 1974), e resultados semelhantes haviam sido previamente relatados para a suplementação com BA (LIPPMANN & LIPPMANN, 1984). Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos mais recentemente por outros autores (LAZZERI et alii, 1987a; KOMATSUDA & OHYAMA, 1988). Entretanto, KOMATSUDA & OHYAMA (1988) relataram uma melhoria da morfologia externa dos embrióides em meio suplementado com 0,1 mg/l de BA. Já o ABA, quando adicionado ao meio de indução, não afetou a morfologia externa dos embrióides (LAZZERI et alii, 1987a). Nesse último caso a concentração de ABA utilizada foi bem menor (0,1 mg/l) que a

utilizada no presente trabalho, podendo explicar as diferenças encontradas. A redução na frequência de embriões normais provavelmente tenha se dado através de uma supressão na atividade meristemática e/ou indução precoce de diferenciação celular, uma vez que nessa concentração de 2,4-D já se tem uma alta frequência de embriões globulares na classe dos embriões considerados normais. Todavia, não foram procuradas evidências histológicas que pudessem comprovar esta hipótese, ficando aí uma sugestão para trabalhos futuros.

A manutenção de parte das culturas suplementadas com ABA no escuro foi testada a fim de se verificar se a presença de luz pudesse estar inibindo uma possível maturação dos embriões, induzida pela presença de ABA no meio de cultura. Esta hipótese foi baseada no fato de que em trabalhos anteriores a maturação dos embriões havia sido feita no escuro (RANCH et alii, 1985; GHAZI et alii, 1986).

Embora este experimento tenha indicado de início um efeito inibitório do ABA e do BA na embriogênese (quantitativa e qualitativamente), esses resultados devem ser vistos com cautela. Isto porque esses reguladores vegetais foram adicionados em meio de indução contendo auxina. Um possível efeito estimulatório desses reguladores de crescimento no processo de maturação só poderia ser melhor esclarecido com a separação das fases de indução e maturação. Isto foi feito posteriormente.

O insucesso em se obter, sob baixas concentrações de auxina, embriões maduros e normais, em quantidade satisfatória, direcionou a pesquisa para a embriogênese sob altas concentrações de auxina (Figura 37 B).

5.4. Efeito dos demais fatores na indução de embriogênese

O efeito obtido com o uso de altas concentrações de auxina oferece uma oportunidade única para se modular de maneira eficiente o processo de embriogênese. A maturação pode ser tratada como uma fase distinta no processo. Esta foi a razão pela qual se deu ênfase, no presente trabalho, em se obter um protocolo de embriogênese somática que produzisse de início exclusivamente embriões no estágio globular, ao contrário da maioria das metodologias previamente relatadas (LIPPMANN & LIPPMANN, 1984; LAZZERI et alii, 1985; BARWALE et alii, 1986). Esse objetivo inicial foi plenamente atingido, obtendo-se embriões perfeitamente globulares, isolados e em quantidade adequada para se prosseguir com os estudos (Tabelas 4 e 5). Os embriões obtidos (Figuras 6 e 9) foram morfológicamente superiores aos obtidos por outros autores que se utilizaram de altas concentrações de auxinas (RANCH et alii, 1986; HARTWECK et alii, 1988).

Procurou-se verificar se os resultados iniciais obtidos eram genótipo-específico ou se existia alguma interação genótipo X meio de cultura (item 4.2.), variando-se as auxinas utilizadas. Além disso, continuou-se a caracterização do processo de embriogênese somática, visando-se determinar outros fatores que pudessem afetar o processo. Após os resultados obtidos com o Experimento 7 (item 4.4.) esta caracterização foi feita para a embriogênese induzida preferencialmente por altas concentrações de 2,4-D ou 2,4,5-T, indistintamente, uma vez que as duas auxinas produziram efeitos qualitativos muito semelhantes (item 4.1.)

O forte efeito do genótipo da planta doadora do

explante (Tabelas 7 e 8) na indução de embriogênese tem sido relatado em outros trabalhos (LAZZERI et alii, 1985; BARWALE et alii, 1986; KOMATSUDA & OHYAMA, 1988; PARROT et alii, 1989). Quanto à interação genótipo X meio de cultura (nesse caso o tipo e concentração de auxina), o único estudo do gênero existente não relata qualquer interação entre o genótipo da planta doadora do explante e o tipo de açúcar empregado no meio de cultura (RANCH et alii, 1986).

A inibição observada na eficiência da embriogênese, causada pela ausência de luz na fase de indução em meio 20D-3 (Tabela 9), é corroborada por resultados obtidos por outros autores, tanto sob altas concentrações de 2,4-D (RANCH et alii, 1986) quanto com NAA (LAZZERI et alii, 1987b). Entretanto, o mesmo não acontece com os resultados opostos obtidos na baixa concentração de 2,4-D. Não existem comparações na literatura feitas nestas condições, assim como não existem relatos da influência da luz na morfologia externa dos embrióides. Deve-se dizer ainda que outros autores, embora não tenham investigado o efeito da luz na embriogênese, mantiveram suas culturas permanentemente no escuro (BARWALE et alii, 1986; KERNS et alii, 1986; BARWALE & WIDHOLM, 1987).

Tanto em meio suplementado com 2,4-D quanto com 2,4,5-T, houve um efeito marcante da posição do explante no meio de cultura na eficiência de embriogênese (Tabela 11). A inoculação feita na posição abaxial foi sempre superior, no aspecto quantitativo. Houve uma tendência, em meio com 11,5 mg/l de 2,4,5-T, de se diminuir a frequência de embrióides normais. Este aspecto pode ser considerado irrelevante uma vez que em valores

absolutos (% de embriões normais x média de embriões produzidos) a eficiência é claramente superior com o explante na posição abaxial. Esta dependência da orientação do explante provavelmente reflete diferenças no estágio de diferenciação celular em que se encontram as diversas células do explante (HARTWECK et alii, 1988). Esses resultados estão de acordo com os dados recentemente apresentados por COLBURN et alii (1988), mas discordam em parte dos dados apresentados por HARTWECK et alii (1988). Esse autor salientou que, sob altas concentrações de 2,4-D (25,0 mg/l), e com o explante na posição abaxial, ocorre uma maior produção de embriões. Entretanto, a grande maioria dos embriões se originou da parte central dos cotilédones e eram morfologicamente anormais. Nessas mesmas condições, os embriões obtidos no presente estudo também se originaram da parte mais central do cotilédone. Porém eles eram quase invariavelmente perfeitamente globulares (Tabela 4 e Figura 6). Estas discrepâncias provavelmente estão relacionadas com o genótipos utilizados e com o "estado fisiológico da planta doadora do explante". Estes aspectos serão discutidos posteriormente.

RANCH et alii (1986) foram os únicos autores a apresentarem resultados sobre o efeito da concentração de sacarose, em meio suplementado com altas concentrações de 2,4-D. Entretanto, foram avaliadas somente duas concentrações de açúcar (3,0 e 6,0 %). Também não foi avaliado o número de embriões e nem a frequência de embriões morfologicamente normais. Os resultados obtidos contrastam com os obtidos no presente estudo (Tabelas 12 e 13). De acordo com os autores, a concentração de 6,0 % de sacarose foi superior à de 3,0%. Evidências de que

concentrações maiores do que 1,5 - 2,0 % de sacarose inibem a embriogênese também foram relatadas em meio com baixas concentrações de 2,4-D (LIPPMANN & LIPPMANN, 1984) ou com NAA (LAZZERI et alii, 1987b).

Em experimentos subsequentes ,no presente estudo, foi usada a concentração de 3,0 % de sacarose, apesar de concentrações menores terem dados maiores valores de eficiência (Tabelas 11 e 12). Isto porque havia uma preocupação de que tanto um crescimento demasiado do calo, quanto um número excessivo de embriões por cotilédone pudessem criar algum impedimento físico para a maturação dos embriões. A concentração de 3,0 % de sacarose permitiu reduzir estes parâmetros, sem comprometer muito a eficiência, especialmente em meio suplementado com 2,4,5-T (Tabelas 11 e 12).

Nenhum dos açúcares testados foi superior à sacarose (Tabela 14). Esses resultados estão de acordo com outros trabalhos que compararam sacarose e glicose, sob baixas concentrações de 2,4-D (LIPPMANN & LIPPMANN, 1984) ou com NAA (LAZZERI et alii, 1987b). Entretanto, existem relatos de que maltose (6,0 %) ou glicose (3,0 %) podem dar melhores respostas (RANCH et alii, 1986). Resultados conflitantes tem sido relatados também no caso de culturas de embriões zigóticos *in vitro*. Alguns autores apontaram um maior crescimento do embrião quando o meio foi suplementado com glicose no lugar de sacarose (ACKERSON, 1984b). Evidências de que a sacarose é o açúcar preferido pelo embrião zigótico foram dadas em outras pesquisas (LICHTNER & SPANSWICK, 1981; RAINBIRD et alii, 1984; DYER et alii, 1987).

Existem relatos de que a L-prolina não afeta a

freqüência de embriogênese somática em soja, usando-se tanto NAA (BARWALE et alii, 1986) quanto 2,4-D em meio sólido (GHAZI et alii, 1986) ou líquido (FINER & NAGASAWA, 1988). Esses resultados corroboram os resultados obtidos no presente trabalho (Tabela 15), mas discordam dos obtidos em outras espécies como o milho e a cenoura (ARMSTRONG & GREEN, 1985). O fato dessas espécies serem regeneradas invariavelmente por embriogênese indireta (via formação de um calo friável) pode explicar estas diferenças.

Dados referentes à suplementação com L-glutamina não foram reportados para a soja, em condições de embriogênese somática em meio sólido. Decidiu-se investigar o efeito desse aminoácido porque existem evidências de que a L-glutamina é importante no desenvolvimento do embrião zigótico *in vitro* (RAINBIRD et alii, 1984; DYER et alii, 1987). Recentemente foi relatado que a L-glutamina estimula a embriogênese em cultura embriogênica em suspensão (FINER & NAGASAWA, 1988). O fato se tratar de dois sistemas diferentes de regeneração pode explicar esta diferença.

Um efeito semelhante ao da adição de aminoácidos foi encontrado na suplementação com CH, EL ou EM (Tabela 17). Mais uma vez não existem relatos na literatura de embriogênese em soja a esse respeito. Entretanto, em espécies como, p. ex., o cacau (*Theobroma cacao*), a adição de CH foi imprescindível na obtenção de embriogênese somática (NOVAK et alii, 1986).

O processo de indução de embriogênese somática em soja se mostrou muito sensível à radiação γ (Tabela 18) quando comparado com outras espécies, como p. ex. em *Citrus sinensis*, onde tratamento com doses de 2,0 KR praticamente não diferiu do

controle (PASQUAL et alii, 1984). O efeito deletério da radiação na maturação dos embriões de soja (Tabela 22) não foi conclusivo e deve ser melhor investigado, usando-se cultivares e meio de cultura com maiores frequência de maturação. Entretanto, um efeito inibitório da radiação γ na diferenciação de embriões foi relatado em *Citrus sinensis* (PASQUAL, 1985), apesar de outros autores (SPIEGEL-ROY & KOCHBA, 1973) terem reportado um efeito estimulatório da radiação γ na diferenciação com doses de 0,5 e 1,0 KR. Assim, o uso de radiação γ como uma forma de se aumentar a frequência de obtenção de somaclones em soja não se mostrou uma alternativa muito promissora.

5.5. Fatores envolvidos na maturação dos embriões

A maturação do embrião em soja parece independe da suplementação do meio de cultura com reguladores vegetais (Tabela 17). Um efeito benéfico do BA na morfologia externa do embrião foi relatado recentemente (KOMATSUDA & OHYAMA, 1988). Entretanto, nesse trabalho o BA foi usado ainda no meio de indução que, por sua vez, era suplementado com NAA e não com 2,4-D. Havia uma certa expectativa de que a adição desse regulador vegetal pudesse auxiliar a maturação. Em *Trifolium repens* o BA altera a polaridade celular e os planos de divisão (MAHESWARAN & WILLIAMS, 1985). Estes eventos estão envolvidos no processo de diferenciação celular e maturação de embriões (AMMIRATO, 1987). Além disso, o BA se mostrou indispensável na conversão de embriões globulares de avelã (*Corylus avellana* L.) em plântulas (PEREZ et alii, 1986). Por outro lado, o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos imaturos de soja, ainda no estágio globular, também não foi favorecido pela

adição de BA no meio de cultura (TILTON & RUSSELL, 1984), corroborando assim os resultados obtidos no presente estudo.

No caso do ABA, diversos autores tem sugerido um efeito estimulatório deste regulador vegetal na maturação dos embriões de soja (RANCH et alii, 1985; RANCH et alii, 1986; GHAZI et alii, 1986) ou mesmo de outras espécies como , p. ex., a cenoura (AMMIRATO ,1983b). Na verdade, os trabalhos feitos com soja foram inspirados nas evidências de que o ABA está envolvido na regulação da embriogênese zigótica *in vivo* da soja (ACKERSON, 1984a) e no crescimento de embriões zigóticos imaturos *in vitro* (ACKERSON, 1984b). Entretanto, o significado real do ABA na embriogênese zigótica ainda é discutível, uma vez que outros trabalhos não confirmam estes resultados (OBENDORF et alii, 1983; TILTON & RUSSEL, 1984; DYER et alii, 1987).

Os dados são insuficientes para excluir completamente um envolvimento do BA ou do ABA no processo de embriogênese somática em soja. Provavelmente, os embriões possam estar sintetizando estes reguladores vegetais em quantidades adequadas, dispensando a suplementação exógena. Os resultados obtidos no presente trabalho são corroborados também por trabalhos recentes onde a maturação foi feita em meios de cultura livre de reguladores vegetais, após indução em meio suplementado com NAA (PARROT et alii, 1988), ou com 2,4-D em altas concentrações (FINER & NAGASAWA, 1988; BUCHHEIM et alii, 1988).

O efeito benéfico observado com a adição de carvão ativado no meio de cultura (Tabela 17) pode ser explicado pelas conhecidas propriedades deste composto em adsorver substâncias orgânicas (AMMIRATO, 1983a). Isto sugere, juntamente com as

observações feitas anteriormente, que a maturação de embriões globulares induzidos sob altas concentrações de auxina (no caso o 2,4-D) depende, exclusivamente, de uma remoção coordenada da auxina. Desta maneira se garante uma passagem progressiva da fase de divisão celular (células meristemáticas) para a fase de diferenciação celular (células vacuoladas, etc.). Nos tratamentos onde houve crescimento dos calos pode ter ocorrido tanto um impedimento de natureza física quanto química para a maturação. Nesse último caso, provavelmente a formação do calo no meio de indução tenha aumentado o carreamento de auxina, ou mesmo a síntese de auxina. Esta hipótese é sustentada pelo fato de que calos de soja acumulam grandes quantidades de hormônios (WRIGHT et alii, 1986). Seria interessante que se conduzisse estudos de maturação com embriões isolados do explante, ao contrário do que foi feito no presente estudo. Esse procedimento demanda, entretanto, a remoção dos embriões do explante, ainda no estágio globular. Nesse estágio os embriões ainda são pequenos, requerendo muito tempo e cuidado na manipulação.

Três outros fatores se mostraram importantes na maturação dos embriões : o genótipo do explante, o meio de indução, e a luz (Tabela 21). Nesse último caso o efeito foi marcante. A presença de luz inibe completamente o processo de maturação. Outros autores também fizeram maturação dos embriões, induzidos sob altas concentrações de 2,4-D, no escuro (RANCH et alii, 1985; GHAZI et alii, 1986). Entretanto, dados comparativos com a maturação feita na presença de luz não foram apresentados. Embriões zigóticos ainda em estágio globular ou de "coração" também foram previamente cultivados no escuro (TILTON & RUSSEL,

1984).

A inibição na maturação verificada no meio com 2,4-D, quando comparado com meio de indução suplementado com 2,4,5-T (Tabela 21), pode estar ligada a uma maior produção de calo no meio 20D-3, como discutido anteriormente. Outra possibilidade seria um efeito direto da alta concentração de auxina no embrióide. Esta hipótese é sustentada também por resultados recentes mostrando que uma exposição prolongada ao NAA (10 mg/l) afetou a morfologia externa dos embrióides. Os embrióides tiveram problemas na formação do meristema apical (PARROT et alii, 1988). O fato de se ter usado, no presente trabalho, concentrações diferentes das duas auxinas não permite uma conclusão mais precisa. Porém, deve-se ter em mente que 17,5 mg/l de 2,4,5-T inibiram drasticamente a indução de embriogênese (Tabela 5), mostrando-se assim ser uma auxina bastante forte. Assim, estes dados podem sugerir também que os possíveis efeitos prejudiciais à maturação produzidos pelo 2,4,5-T seriam, de alguma forma, menores ou mais facilmente reversíveis. Um efeito inibitório do 2,4-D na maturação de embrióides foi sugerido em outras espécies (HALPERIN & WETHERELL, 1964; FUJIMURA & KOMAMINE, 1980; EVANS et alii, 1981). Em embrióides de soja induzidos com 10,0 mg/l de NAA ou 2,0 mg/l de 2,4-D (uma concentração baixa) não houve uma contribuição do tipo de auxina na frequência de germinação dos embrióides (KOMATSUDA & OHYAMA, 1988). Melhores estudos devem ser feitos para responder esta questão, tomando-se o cuidado de se distinguir as fases de indução e maturação.

Não existem dados na literatura sobre o efeito do genótipo na maturação dos embrióides em soja. Diversos estudos tem

relatado diferenças genotípicas na frequência de germinação (CRANCH et alii, 1985; KOMATSUDA & OHYAMA, 1988; PARROT et alii, 1988; SHOEMAKER & HAMMOND, 1988). Estes resultados provavelmente estão refletindo diferenças na maturação, uma vez que a morfologia externa dos embrióides e a frequência de germinação estão fortemente correlacionadas (LAZZERI et alii, 1987b; HARTWECK et alii, 1988; PARROT et alii, 1988). Fica evidente assim que o presente trabalho deve ser seguido por uma pesquisa para se identificar, no germoplasma brasileiro de soja, cultivares que melhor se adaptem à metodologia aqui desenvolvida.

5.6. Origem dos embrióides

As observações anatômicas feitas no presente estudo sugerem que os embrióides obtidos em soja, tanto em baixa quanto em altas concentrações de auxinas (2,4-D ou 2,4,5-T), tem origem multicelular a partir de células da epiderme e sub-epiderme (Figuras 31 e 32). As altas concentrações de auxina parecem formar um tecido meristemático mais uniforme, sem a presença de células não meristemáticas (vacuoladas), ao mesmo tempo em que devem assegurar o estado meristemático por mais tempo, evitando uma diferenciação celular precoce, p. ex., uma vacuolização precoce. Outras evidências também corroboram essa hipótese : A elevação da concentração de auxina aumentou principalmente o número de embrióides formados (Tabelas 4 e 5), com a frequência de embriogênese permanecendo relativamente constante. Assim, seria razoável se admitir que o potencial embriogênico do explante já estaria pré-determinado (PEDC) e que a auxina só estaria contribuindo para que um grupo dessas células entrassem e se

mantivessem coordenadamente em divisão celular (WILLIAMS & MAHESWARAN, 1986). Além disso, o aumento na concentração de auxina reduziu o crescimento do explante e a formação de protuberâncias (Figura 7), que provavelmente eram centros embriogênicos mal sucedidos na divisão celular. Formações semelhantes a essas foram encontradas em outros trabalhos, sob baixas concentrações de 2,4-D (LIPPMANN & LIPPMANN, 1984; HARTWECK et alii, 1988).

Também parece estar descartada a hipótese do envolvimento do calo na formação do embrióide, especialmente nas baixas concentrações de auxina (Figura 31). Nas concentrações maiores de auxina parece haver uma rápida proliferação do calo nas células da sub-epiderme (futuras células parênquimáticas abaixo da epiderme) (Figuras 30 e 32). O fato dos parâmetros relativos à embriogênese responderem, na maioria dos experimentos, de maneira independente da frequência de calogênese e do grau de crescimento dos calos (Tabelas 4 ,9 ,11, etc.), também pode ser considerado uma evidência indireta da embriogênese via direta.

Alguns autores haviam sugerido a embriogênese indireta em soja, em meio suplementado tanto com NAA (BARWALE et alii, 1986) quanto com altas concentrações de 2,4-D (GHAZI et alii, 1986). Entretanto, estes autores basearam-se apenas em observações morfológicas das culturas, sem apresentarem evidências histológicas. Observações desta natureza podem levar à interpretações errôneas (Figura 29). Deve-se dizer também que a manutenção destes calos friáveis isoladamente em meio de indução, jamais produziu embrióides ou mesmo tecido embriogênico (dados não apresentados). Recentemente foram apresentados resultados (HARTWECK et alii, 1988), com base em observações histológicas,

que corroboram estas hipóteses de embriogênese via direta e origem multicelular dos embrióides, sugeridas no presente estudo.

A Figura 40 sumariza esquematicamente o que foi discutido acima, assim como no item 5.4. , propondo um modelo para a origem e desenvolvimento dos embrióides a partir de cotilédones imaturos de soja. O esquema mostra a formação concomitante de calo e de embrióide. Entretanto, esses processos se mostraram independentes, e portanto podem evoluir assincronicamente. Além disso, o próprio processo de indução de embriogênese mostrou-se ser dessincronizado (item 4.1.2.). Isto explica as diferenças observadas na formação do calo e do embrióide quando se compara as Figuras 32 e 40B.

5.7. Estado fisiológico do explante

Um cuidado muito especial deve ser tomado ao se estabelecer culturas embriogênicas de soja. As plantas doadoras do explante devem estar vigorosas e sadias. Tentativas de se induzir, no presente trabalho, embriogênese somática a partir de plantas que sofreram algum tipo de estresse, especialmente fotoperíodo curto e/ou baixas temperaturas, foram mal sucedidas (dados não apresentados). Nessas condições mesmo concentrações muito altas (20 mg/l) de auxina (2,4-D ou 2,4,5-T) falharam em induzir embrióides perfeitamente globulares. Os embrióides obtidos nestas condições eram em menor número e apresentavam as mesmas anormalidades observadas, sob condições normais, nas baixas concentrações de 2,4-D. Um explante em boas condições apresentava o tamanho ideal e ao mesmo tempo uma coloração verde clara, sendo facilmente isolado da testa da semente (a testa ainda não estava

Figura 40.

Modelo proposto para origem dos embriões de soja a partir de cotilédones imaturos. A. Grupo de células embriogênicas pré-determinadas (seta 1), na epiderme e sub-epiderme da face abaxial do explante. B. Sob altas concentrações de auxina (2,4-D ou 2,4,5-T) estas células readquirem a capacidade meristemática (células escuras). Na face adaxial as células não embriogênicas respondem às auxinas formando calo (seta 2). C e D. Progressões da embriogênese e da calogênese. As altas concentrações de auxina interrompem a ontogênese no estágio globular do desenvolvimento por assegurar o estágio meristemático das células. E. Sob baixas concentrações de auxina, falhas na indução ou na manutenção da atividade meristemática levariam à diferenciação precoce das células, descordenando o grupo de células embriogênicas. F e G. A vacuolização celular precoce é um dos eventos envolvidos na diferenciação, levando a um maior crescimento das estruturas e interrompendo a ontogênese frequentemente em estádios pós-globulares. Diversos tipos morfológicos de embriões podem se formar, dependendo da intensidade com que a diferenciação precoce ocorra.

intimamente aderida no embrião).

Essas observações muito provavelmente estão relacionadas com o que tem sido denominado na literatura de "estado fisiológico (ou ontogenético) do explante", e que certamente refletem um determinado estado genético-bioquímico único que permite que as células entrem corretamente no processo de embriogênese (WILLIAMS & MAHESWARAN, 1986; RANCH & PACE, 1988). Elas podem explicar diferenças algumas vezes observadas ao se comparar resultados de um mesmo tratamento em experimentos diferentes (veja o desempenho do meio 20D-3 nas Tabelas 4, 9, 18), assim como resultados discordantes obtidos em outros trabalhos (COLBURN et alii, 1988). Outros autores também relataram variações consideráveis nos resultados obtidos com um mesmo tratamento em experimentos diferentes (LAZZERI et alii 1987 a e b). Esse aspecto também pode ser evidenciado ao se comparar resultados relatados em diferentes trabalhos de um mesmo grupo de pesquisa (veja resultados obtidos por LAZZERI et alii (1987a e b), HARTWECK et alii (1988), e PARROT et alii (1988) na Tabela 23).

O forte efeito do genótipo da planta doadora do explante também pode ser uma consequência do estado fisiológico da mesma, levando-se em consideração que cada genótipo deve ter sua maior ou menor adaptação a uma determinada condição ambiental.

5.8. Considerações finais e perspectivas futuras

Com base nos resultados obtidos no presente estudo foi estabelecido um protocolo para a regeneração de plântulas de soja via embriogênese somática, e que está apresentado na Figura 41. Esta metodologia tem se mostrado reproduzível nas nossas

Tabela 23. Valores^a relatados na literatura para os parâmetros média de embriões por cotilédono (Me), frequência de embriogênese (F), eficiência (E), frequência de maturação (Ma), e frequência de germinação (G).

Referência	Auxina utilizada ^b	F (%)	Me (n°)	E (n°)	Ma ^d (%)	G (%)
RANCH et alii, 1985	2,4-D (5,0)	67	n.r. ^c	n.o	89	69
GHAZI et alii, 1986	2,4-D (10,0)	59	2,42	1,16	n.r.	20
LAZZERI et alii, 1987a e b	2,4-D (5,0)	60	3,40	2,04	13	n.r.
	NAA (10,0)	98	3,63	3,36	51(51)*	n.r.
KOMATSUDA & OHYAMA, 1988	2,4-D (2,0)	95 (53)	3,50	n.r.	n.r.	58*(9)
	NAA (10,0)	95 (45)	4,71	n.r.	n.r.	58
HARTWEG et alii, 1988	2,4-D (25,0)	n.r.	11,13	n.r.	5	n.r.
	NAA (10,0)	n.r.	2,00	n.r.	31	n.r.
PARROT et alii, 1988	NAA (10,0)	n.r.	0,57	n.r.	n.r.	n.r.
SHOEMAKER & HAMMOND, 1988	2,4-D (20,0)	n.r.	n.r.	n.r.	30	70
ESTE ESTUDO	2,4-D (20,0)	81 (77)	9,46	7,30	25	n.r.
	2,4,5-T (11,5)	81 (65)	9,64	6,22	46	n.r.

a: valores máximos relatados nos referidos trabalhos, com diferentes genótipos, meios de cultura, etc.

b: (mg/l)

c: não foi relatado

d: engloba a frequência de embriões morfológicamente normais nos casos em que a maturação não foi separada das outras fases

e: valores obtidos nas condições onde se obteve a maior média de embriões por explante

f: não foi distinguido o meio em que os embriões foram produzidos

condições. Deve se dizer também que ela ainda é passível de ser melhorada com a conclusão de novos estudos, sobretudo identificação de genótipos mais eficientes na indução e/ou maturação dos embrióides.

Três aspectos devem ser considerados importantes na exploração da variação somaclonal com fins de melhoramento genético. Um grande número de plantas deve ser regenerado e avaliado, devido à tendência de produção de linhagens inferiores (LEE et alii, 1988). Em segundo lugar, a maioria das espécies onde vem sendo relatada a ocorrência de variação somaclonal são regeneradas por embriogênese via indireta (SCOWCROFT et alii, 1987). Análises citológicas feitas em calos de diversas espécies mostram a ocorrência de um grande número de instabilidades cromossômicas (BAYLISS, 1980; KRIKORIAN et alii, 1983). Entretanto, não existe ainda nenhum estudo que compare as frequências de variação somaclonal obtida via direta com a obtida via indireta. Além disso, a ocorrência de variação somaclonal já foi relatada em soja (BARWALE & WIDHOLM, 1987), mesmo com uma provável origem dos embrióides via direta (HARTWECK et alii, 1988). O terceiro aspecto a ser considerado seria a origem unicelular dos embrióides, importante para se evitar a formação de quimeras. Aqui pode estar a maior limitação da metodologia desenvolvida no presente estudo. No único relato de variação somaclonal em plantas de soja, os embrióides foram induzidos em meio suplementado com 10,0 mg/l de NAA (BARWALE & WIDHOLM, 1987). Nessas condições os embrióides podem ter origem unicelular, embora a origem multicelular parece ser o modo de origem mais frequente (HARTWECK et alii, 1988). Diante dessa falta de conhecimento sobre

as causas exatas da variação somaclonal (SCOWCROFT et alii, 1987), e da carência de relatos de ocorrência de variação somaclonal em soja, o aspecto preponderante passa a ser a obtenção de um grande número de plantas que pudessem ser examinadas quanto a ocorrência de alterações genéticas. A metodologia desenvolvida no presente estudo apresentou um grande potencial nesse aspecto, com resultados que indiscutivelmente superam os relatados até o presente momento na literatura (Tabela 23).

A obtenção de plantas transgênicas foi recentemente relatada em soja, usando-se o sistema de regeneração via organogênese em nó cotiledonar. Todavia, as frequências de transformação obtidas foram muito baixas, e houve a produção de quimeras (CHINCHEE et alii, 1988; Mc CABE et alii, 1988). As plantas regeneradas dessa forma sabidamente tem origem multicelular (WRIGHT et alii, 1986). Esse mesmo problema ocorre com a metodologia aqui desenvolvida. Tal fato pode comprometer a obtenção de plantas transgênicas a partir de cotilédones imaturos infectados por *Agrobacterium tumefaciens* (OWENS & CRESS, 1985; OWENS & SMIGOCK, 1988). Para contornar esse problema, poderia ser usado um esquema de "embriogênese somática secundária", semelhante ao empregado na obtenção de plantas transgênicas de nogueira (*Juglans regia* L.) (Mc GRANAHAHAN, 1988). A Figura 42 esquematiza este sistema adaptado à metodologia desenvolvida no presente trabalho. Para isto seria importante se obter um grande número inicial de embrióides total ou parcialmente transformados. Esses embrióides serviriam de inóculo (explantos) para um novo ciclo de embriogênese somática. A embriogênese se daria em meio contendo um antibiótico, p. ex. a kanamicina, para garantir que somente as

regiões transformadas (o gene para resistência à kanamicina acompanharia o gene que se deseja introduzir) se dividam e entrem num novo ciclo de embriogênese. O uso de meio seletivo também foi indispensável na obtenção de plantas transgênicas a partir de nó cotiledonar de soja (HINCHEE et alii, 1988). Embora o presente estudo não tenha investigado a embriogênese secundária, ela foi recentemente caracterizada em soja (FINER & NAGASAWA, 1988).

1. Inocular cotilédones imaturos com 3 a 6 mm de comprimento em meio 11,5T-3, na posição abaxial.
2. Após 25-30 dias, transferir os explantes contendo embrióides perfeitamente globulares para maturação em meio MS sólido + 0,5 % de carvão ativado. Remover um pouco do calo friável que se formou concomitantemente com os embrióides.
3. Após 45 dias de maturação, remover os embrióides morfológicamente normais (com pelo menos um cotilédone definido, eixo hipocótilo-radícula desenvolvido e gema apical evidente) para germinação em meio MS líquido, com agitação suave, trocando-se o meio semanalmente.
4. Após 15-21 dias transferir as plântulas para meio MS sólido (para um maior desenvolvimento tanto da raiz quanto da parte aérea) , e em seguida para pequenos vasos com vermiculita, regando-se com solução nutritiva de Hoagland. As plantas bem estabelecidas são transferidas para vasos com terra.

Figura 41. Protocolo utilizado para a regeneração de plântulas de soja via embriogênese somática

Figura 42. Esquema geral de um possível protocolo para a transformação de soja, via embriogênese somática. NPT II = neomicina fosfotransferase, confere resistência à kanamicina ; GUS = β glucoronidase, permite identificar visualmente as células e tecidos transformados. Uma outra possibilidade seria dispensar a etapa de maturação dos embriões entre um ciclo e outro, ou mesmo o uso de cultura embriogênica em suspensão recentemente descrito. Modificado de McGRANHAM (1988).

6. CONCLUSÕES

. Foi possível de se obter um protocolo reproduzível (veja Figura 41) para a regeneração de plântulas de soja via embriogênese somática. Essa metodologia se mostrou quantitativamente muito promissora para futuras aplicações em trabalhos de obtenção de somaclones e/ou de plantas transgênicas de interesse para a Genética e Melhoramento da Soja. Além disso, o processo de embriogênese somática evidenciou, nas condições do presente trabalho, algumas características :

. Altas concentrações de auxina (10-25 mg/l de 2,4-D ou 11,5-17,5 mg/l de 2,4,5-T) interrompem a ontogênese do embrióide no estágio globular, provavelmente por assegurar o estado meristemático das células.

. Baixas concentrações destas auxinas promovem um desenvolvimento (crescimento e diferenciação) precoce dos embrióides formados, originando embrióides organografica e anatomicamente anormais. A vacuolização é um dos eventos celulares envolvidos.

. Os embrióides tem origem direta e multicelular , a partir de células da epiderme e sub-epiderme do cotilédone.

. A sacarose, em concentrações variando de 1,0 - 2,0 % é o açúcar que proporciona maior eficiência de indução de embriogênese.

. A indução de embriogênese é muito sensível à radiação γ . A dose de 0,2 KR se mostrou a mais adequada para futuros trabalhos visando a obtenção de somaclones.

. A adição de L-glutamina, L-prolina, caseína hidrolizada, extrato de malte, ou extrato de levedura não estimula a indução de embriogênese.

. O explante deve ser colocado no meio de cultura na posição abaxial. Não se observou interação entre o meio de cultura e a posição do explante.

. O ABA e o BA exógenos inibem fortemente o processo de indução de embriogênese sob baixas concentrações de 2,4-D e não favorecem a maturação dos embriões globulares induzidos sob altas concentrações da auxina.

. Tanto a indução de embriogênese quanto a maturação dos embriões são fortemente afetadas pelo genótipo da planta doadora do explante. Não se evidencia interação entre genótipo e o meio de cultura (tipo e concentração de auxina).

. A luz favorece a indução de embriogênese sob altas concentrações de 2,4-D, mas inibe completamente a maturação dos embriões.

. Embriões induzidos por 2,4,5-T tem maior frequência de maturação e são morfológicamente superiores aos induzidos em meio suplementado com 2,4-D.

7. BIBLIOGRAFIA

- ACKERSON, R.C. Regulation of soybean embryogenesis by abscisic acid. *Journal of Experimental Botany*, 35:403-413, 1984.
- ACKERSON, R.C. Invertase activity and abscisic acid relation to carbohydrate status in developing soybean reproductive structures. *Crop Science*, 25:615-618, 1985.
- AMER, I.M.; HOPPENWORTH, J.M.; WIDHOLM, J.M. Effect of amino acid analogs and herbicides on the growth of organogenic soybean tissue cultures. *Soybean Genetic Newsleter*, 15: 106-109, 1988.
- AMMIRATO, P.V. & STEWARD, F.C. Some effects of the environment on the development of embryos from cultered free cells. *Bot. Gaz.* 132:149-158, 1971.
- AMMIRATO, P.V. The regulation of somatic embryo development in plant cell cultures : Suspension culture techniques and hormone requirements. *BioTechnology*, 1:68:74, 1983a.
- AMMIRATO, P.V. Embryogenesis. In : Evans, D.A.; Sharp, W.R.; Ammirato, P.V.; Yamada, Y., eds., *Handbook of Plant Cell Culture*, vol. 1, New York, NY, Macmillan, 1983b, pp. 82-123.

- AMMIRATO, P.V. Patterns of development in culture. In: Henke, R.R.; Hughes, K.W.; Constantin, M.P. , eds. **Tissue Culture in Forestry and Agriculture**, New York, Plenum, 1985. pp. 9-29.
- AMMIRATO, P.V. Carrot. In : Evans, D.A.; Sharp, W.R.; Ammirato, P.V.; Yamada, Y., eds., **Handbook of Plant Cell Culture**, vol. 4, New York, NY, Macmillan, 1986, pp. 457-499.
- AMMIRATO, P.V. Organizational events during somatic embryogenesis. In: Green, C.E et alii, eds. **Plant tissue and cell culture** .New York, NY, Alan R.Liss, Inc., 1987, pp. 57-81.
- ARMSTRONG, G.L. & GREEN, C.E. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. **Planta**, 164:207-214, 1985.
- BARWALE, U.B.; KERNS, H.R.; WIDHOLM, J.M. Pant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. **PLANTA**, 167:473-481, 1986.
- BARWALE, U.B. & WIDHOLM, J.M. Somaclonal variation in plants regenerated from cultures of soybean. **Plant Cell Reports**, 6:365-368, 1987.
- BAYLISS, M.W. Chromosomal variation in plant tissues in culture. **International Review of Cytology**, 11A:113-143, 1980.
- BEVERSDORF, W.D. & BINGHAM, E.T. Degrees of differentiation

obtained in tissue cultures of *Glycine* species. *Crop Science*, 17:307-311, 1977.

BIDWELL, R.G.S. *Plant Physiology*. New York, Macmillan Publishing Co., 1974. 644p.

BONATO, E.R. & BONATO, A.L. *A soja no Brasil : História e estatística*. EMBRAPA, Londrina, 1987. 61p.

BUCHHEIM, J.; COLBURN, S.; RANCH, J.P. Maturation and germination kinetics of soybean somatic embryos. In : *Thirty-ninth Annual Meeting of The Tissue Culture Association*, June 12-15, 1988, Las Vegas, NV. Abstracts. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 24:38A , 1988.

CHEE, R.P. & CANTLIFFE, D.J. Somatic embryony patterns and plant regeneration in *Ipomoea batatas* Poir. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* , 24: 955-958, 1988.

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

COLBURN, S.; BUCHHEIM, J.; RANCH, J.P. Anatomy and morphology of somatic embryogenesis from soybean cotyledons. In : *Thirty-ninth Annual Meeting of The Tissue Culture Association*, June 12-15, 1988, Las Vegas, NV. Abstracts. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 24:60A , 1988.

DYER, J.D.; COTTERMAN, C.D.; COTTERMAN, J.C. Comparison of *in situ* and *in vitro* regulation of soybean seed growth and development. *Plant physiology*, 84:298-303, 1987.

EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; FLICK, C.E. Growth and behaviour of cell cultures : Embryogenesis and organogenesis. In : Thorpe, T.A. ed., *Plant Tissue Culture : Methods and Application in Agriculture* . Academic Press, New York, 1981, p. 45-113.

FINER, J. & NAGASAWA, A. Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* Merrill). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 15:125-136, 1988.

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

GHAZI, T.D.; CHEEMA, H.V.; NABORS, M.W. Somatic embryogenesis and plant regeneration from embryogenic callus of soybean, *Glycine max* L.. *Plant Cell Reports*, 5:452-456, 1986.

GHAZI, T.D.; HANNING, G.E.; NABORS, M.W. Plant regeneration from soybean callus cultured on media containing NaCl. *Soybean Genetics Newsletter*, 15:93-95, 1988.

GOLDBERG, R.B. Plants : Novel Developmental Processes. *Science*, 240:1460-1467, 1988.

GOODMAN, R.M.; KISER, J. Biothecnology and its impact on the future developments in soybean production and use. In: Shibles, R. ed. World Soybean Research Conference III. Proceedings. Westview Press Boulder and London, 1985, p. 261-271.

GRAY, L.E.; GUAN, Y.K.; WIDHOLM, J.M. Reaction of soybean callus in culture to filtrates of *Phyalophora gregata*. *Plant Science*, 47:45-55, 1986.

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

HAMMAT, N. & DAVEY, M.R. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured zygotic embryos of soybean (*Glycine max* L.). *Journal of Plant Physiology*, 128:219-226, 1987.

HARTWECK, L.M.; LAZZERI ,P.A.; CUI, D.; COLLINS, G.B.; WILLIAMS, E.G. Auxin-orientation effects and histological analysis of soybean somatic embryogenesis. *In Vitro Cell Developmental Biology*, 24:821-828, 1988.

HINCHEE, M.A.W.; CONNOR-WARD, D.V.; NEWELL, C.A; Mc DONNELL, R.E.; SATO, S.J.; HORSH, R.B. Production of transgenics soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *BioTechnology* , 6:915-922, 1988.

- HIROMOTO, D.M. & VELLO, N.A. The genetic base of brasilian soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivars. *Revista Brasileira de Genética*, 9:295-306, 1986.
- HOODGES, T.K.; KAMO, K.K.; IMBRIE, C.W.; BECWAR, M.R. Genotype specificity of somatic embryogenesis and regeneration in maize. *BioTechnology* 4: 219-223, 1986.
- KAMADA, H. & HARADA, H. Studies on the organogenesis in carrot tissue cultures. I. Effect of growth regulators on somatic embryogenesis and root formation. *Z. Pflanzenphysiology* , 91:255-266, 1979.
- KERNS, H.R.; BARWALE, U.B.; MEYER, M.M.; WIDHOLM, J.M. Correlation of cotyledonary node proliferation and somatic embryoid development in suspension cultures of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Plant Cell Reports* , 5:140-143, 1986.
- KIHL, R.A.S.; ALMEIDA, L.A.; DALL'AGNOLL, A. Strategies for cultivar development in the tropics. In : Shibles, R.D., ed., *World Soybean Research Conference III*, Ames, 1984. Proceedings. Boulder, Westview Press, 1985, pp.301-304.
- KOMATSUDA, T. & OHYAMA, K. Genotypes of high competence for somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean, *Glycine max*. *Theoretical and Applied Genetics*, 75:695-700, 1988.
- KONAR, R.N.; THOMAS, E.; STREET, H.E. Origin and structure of

embryoids arising from epidermal cells on the stem of *Ranunculus sceleratus* L. *Journal of Cell Science* , 11:77-93, 1972.

KRIKORIAN, A.D.; O'CONNOR, S.A.; FITTER, M.S. Chromosome number variation and karyotype stability in culture and culture-derived plants. In : Evans, D.A.; Sharp, W.R.; Ammirato, P.V.; Yamada, Y.,eds. *Handbook of Plant Cell Culture*, vol. 1, New York, Mcmillan, 1983, pp. 541-581.

LAZZERI, P.A.; HILDEBRAND, D.F.; COLLINS, G.B. A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean. *Plant Molecular Biology Reporter*, 31:160-167, 1985.

LAZZERI, P.A.; HILDEBRAND, D.F.; COLLINS, G.B. Soybean somatic embryogenesis: Effects of hormones and culture manipulations. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 10:197-208, 1987a.

LAZZERI, P.A.; HILDEBRAND, D.F.; COLLINS, G.B. Soybean somatic embryogenesis: Effects of nutritional, physical and chemical factors. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* , 10: 209-220, 1987b.

LEE, M.; GEADELMANN, J.L.; PHILIPS, R.L. Agronomic evaluation of inbred lines derived from tissue cultures of maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 75:841-849, 1988.

LI, B.J.; LANGRIDGE, W.H.R.; SZALAY, A.A. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in the soybean, *Glycine max*. *Plant Cell*

Reports, 4:344-347, 1985.

LICHTNER, F.T. & SPANSWICK, R.M. Sucrose uptake by developing soybean cotyledons. *Plant Physiology*, 68:693-698, 1981.

LIPPMANN, B. & LIPPMANN, G. Induction of somatic embryos in cotyledonary tissue of soybean, *Glycine max* L. Merr. *Plant Cell Reports*, 3:215-218, 1984.

MAHESWARAN, G. & WILLIAMS, E.G. Origin and development of somatic embryos formed directly on immature embryos of *Trifolium repens* *in vitro*. *Annals of Botany*, 56:619-630, 1985.

Mc CABE, D.E.; SWAIN, F.W.; MARTINELLI, B.J.; CHRISTOU, P. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *BioTechnology*, 6:923-926, 1988.

Mc GRANAHAN, G.H.; LESLIE, A.G.; URATSU, S.L.; MARTIN, L.A.; DANDEKA, A.M. *Agrobacterium*-mediated transformation of walnut somatic embryos and regeneration of transgenic plants. *BioTechnology*, 6:800-804, 1988.

Mc WILLIAM, A.A.; SMITH, S.M.; STREET, H.E. The origin and development of embryoids in suspension cultures of carrot (*Daucus carota*). *Annals of Botany*, 38:243-250.

MYASAKA, S. & MEDINA, J.C. (eds). *A soja no Brasil*. ITAL, Campinas, 1981. 1062 p.

NOVAK, F.J.; DONINI, B.; OWUSU, G. Somatic embryogenesis and in vitro plant development of cocoa (*Theobroma cacao*). In: IAEA, ed. Proceedings. Nuclear Techniques and in vitro Culture for Plant Improvement, 19-23 August, 1985, Vienna, p.443-449.

OBENDORF, R.L. & SLAWINSKA, J. Maturation of soybean somatic embryos to a desiccation tolerant state. In : Thirty-ninth Annual Meeting of The Tissue Culture Association, June 12-15, 1988, Las Vegas, NV. Abstracts. In Vitro Cellular and Developmental Biology, 24:71A , 1988.

OWENS, L.D. & CRESS, D.E. Genotypic variability of soybean response to *Agrobacterium* strains harboring the Ti or Ri plasmids. Plant Physiology, 77:87-92, 1985.

OWENS, L.D. & SMIGOCK, A.C. Transformation of soybean cells using mixed strains of *Agrobacterium tumefaciens* and phenolic compounds. Plant Physiology, 88:570-573, 1988.

PARROT, W.A.; DRYDEN, G.; VOGT, S.; HILDEBRAND, D.F.; COLLINS, G.B.; WILLIAMS, E.G. Optimization of somatic embryogenesis and embryo germination in soybean. In Vitro Cellular Developmental Biology, 24:817-820, 1988.

PARROT, W.A.; WILLIAMS, E.G.; HILDEBRAND, D.F.; COLLINS, G.B. Effect of genotype on somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean. Plant Cell Tissue and Organ Culture,

16:15-21, 1989.

PASQUAL, M.; ANDO, A.; TULMANN NETO, A.; MENTEN, J.O.M. Obtenção de mutantes *in vitro* por irradiação de tecido nucelar de Citrus (*Citrus sinensis*). In : Cerri, C.C. & Athié, D., eds. Seminário Regional Sobre Técnicas Nucleares na Produção de Plantas Agrícolas. Anais. Piracicaba, 1984. pp. 55-59.

PASQUAL, M. Regeneração de plantas *in vitro* e radiosensitividade de tecidos nucleares de citros. Piracicaba, 1985. 106p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" / USP).

PEREZ, G.; RODRIGUEZ, R.; TAMES, R.S. Regulation of asexual embryogenesis in filber cotyledonary nodes. Morphological variability. *Plant Science*, 45: 59-64, 1986.

RAINBIRD, R.M.; THORNE, J.H.; HARDY, R.W.F. Role of amides, amino acids, and ureides in the nutrition of developing soybean seeds. *Plant Physiology*, 74:329-334, 1984.

RANCH, J.P.; OGLESBY, L.; ZIELINSKI, A.C. Plant regeneration from embryo-derived tissue cultures of soybeans. *In Vitro*, 21:653-657, 1985.

RANCH, J.P.; OGLESBY, L.; ZIELINSKI, A.C. Plant regeneration from tissue culture of soybean by somatic embryogenesis. In : Vasil, I.K. ed. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. New

York, NY, Academic Press, 1986. Vol 3 pp. 97-110.

RANCH, J.P. & PAGE, G.M. Science in the art of plant regeneration from cultured cells : an essay and a proposal for a conceptual framework. *Iowa State Journal of Research*, 62:537-569, 1988.

ROTH, E.J.; LARK, K.G.; PALMER, R.G. Use of tissue culture as a tool in soybean improvement. In : Shibles, R., ed. *World Soybean Research Conference III. Proceedings*. Westview Press. Boulder and London, 1985, pp. 237-280.

SCOWCROFT, W.R.; BRETTELL, R.I.S.; RYAN, S.A.; DAVIES, P.A.; PALLOTTA, M.A. Somaclonal variation and genomic flux. In : Green, C.E. et alii, eds. *Plant Tissue and Cell Culture*. New York, NY, Alan R. Liss, Inc., 1987, pp. 275-286.

SHOEMAKER, R.C. & HAMMOND, E.G. Fatty acid composition of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) somatic embryos. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 24:829-832, 1988.

SPIEGEL-ROY, J. & KOCHBA, J. Mutation breeding in Citrus . In : IAEA, ed. *Induced Mutations in Vegetatively Propagated Plants*. Viena, 1973. pp 91-104.

TILTON, V.R. & RUSSELL, S.H. *In vitro* culture of immature soybean embryos. *Journal of Plant Physiology*, 115:191-200, 1984.

ZIMMERMAN, T.W. & ROBACKER, C.D. Media and gelling agent effect on

cotton callus initiation from excised hypocotyls. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* , 15:269-274, 1988.

WILLIAMS, E.G. & MAHESWARAM, G.M. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany*, 57:443-462, 1986.

WRIGHT, M.S.; KOEHLER, S.M; HINCHEE, M.A; CARNES, M.G. Plant regeneration by organogenesis in *Glycine max*. *Plant Cell Reports*, 5:150-154, 1986a.

WRIGHT, M.S.; CARNES, M.G.; HINCHEE, M.A; DAVIS, G.C; KOELER, S.M; WILLIAMS, M.H; COLBURN, S.M; PIERSON, P.E. Plant regeneration by from tissue cultures of soybean by organogenesis. In : Vasil, I.K., ed. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. New York, NY, Academic Press, 1986b, Vol 3, pp. 111-119.