**ESTUDOS ANATÔMICOS DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA *in vitro* EM
SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill)**

JULIANA APARECIDA FERNANDO

Bióloga

Orientador: Prof. Dra. **BEATRIZ APPEZZATO-DA-GLÓRIA**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de Concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Novembro - 1999

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - campus "Luiz de Queiroz"/USP

Fernando, Juliana Aparecida

Estudos anatômicos da embriogênese somática *in vitro* em soja (*Glycine max* (L.) Merrill) /
Juliana Aparecida Fernando. - Piracicaba, 1999.
60 p. : il.

Dissertação (mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1999.
Bibliografia

1. Anatomia vegetal 2. Cultura de tecido 3. Embriogênese somática 4. Soja I. Título

CDD 633.34

à DEUS

e a todos que não tiveram oportunidade de estudar

OFEREÇO

Aos meus pais João (*in memoriam*)
e Diomar e minha avó Maria

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Beatriz Appezzato-da-Glória, pela orientação, grande contribuição na minha formação acadêmica e principalmente pela amizade. Obrigada.

À Profa. Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP), pela co-orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Isaías Olivio Geraldi do Departamento de Genética da ESALQ, pela cessão das sementes dos genótipos de soja utilizados neste trabalho, do espaço para sua multiplicação e auxílio na interpretação dos dados obtidos.

À Profa. Dra. Sônia Maria De Stefano Piedade do Departamento de Ciências Exatas da ESALQ, pelo auxílio nas análises estatísticas.

À Profa. Dra. Maria Helena Pelegrielli Fungaro da Universidade Estadual de Londrina, pelo auxílio na obtenção de sementes junto ao Centro Nacional de Pesquisa de Soja - Embrapa (CNPSo).

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Soja - Embrapa - Londrina (CNPSo), pela cessão de sementes.

Ao Dr. Wayne Parrott do Department of Crop and Soil Sciences, UGA, Athens - USA, pelas informações fornecidas.

À farmacêutica Sra. Marli Kasue Misaki Soares, técnica do Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ, pelo valioso auxílio nas técnicas e principalmente pela amizade.

Ao biólogo Carlos Alberto de Oliveira, técnico de laboratório, e Lissandra Muzzarinho, auxiliar de laboratório, ambos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Plantas do Departamento de Genética da ESALQ, pelos auxílios prestados e amizade.

Aos professores e funcionários do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ, pela amizade e pelos auxílios prestados.

Aos funcionários Cláudio Roberto Segatelli e Aparecido da Silva, responsáveis pela área de campo experimental do Departamento de Genética da ESALQ/USP, pelo auxílio na identificação de infestações da cultura e fornecimento de defensivos.

Ao Prof. Dr. Elliot W. Kitajima do Núcleo de Apoio à Pesquisa - Microscopia Eletrônica na Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) da ESALQ, por ter possibilitado o processamento do material para microscopia eletrônica de varredura.

À bibliotecária Eliana Maria Garcia Sabino, pela revisão das referências bibliográficas.

À Enga. Agra. Dra. Vera Maria Quecini, pelo auxílio na correção do summary e registros fotográficos.

À bióloga MS. Adriana Cristina Alves, pela leitura da revisão bibliográfica.

À bióloga MS. Adriana Hissae Hayashi, pela revisão final do trabalho.

Às amigas e companheiras Adriana Cristina Alves, Vera Maria Quecini e Mariza Monteiro, pelo apoio, amizade, ajuda nos momentos mais difíceis e pelas longas conversas. Muito obrigada.

À Monalisa Carneiro e Elizabete Keiko Takahashi, pela ajuda nas interpretações dos dados estatísticos.

Ao Sr. Osvaldo J. S. Soares, pelos registros fotográficos.

Às amigas Edna Teresa Alavarce, Adriana Hayashi, Telma Hayashi, Lucimara Antonioli e Alessandra Monteiro, pela amizade.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Plantas: Ilene Passos, Maria Imaculada Zucchi, Luciana Rossini, Paulo Barroso e Heiko Rossman.

A todos os colegas do curso de pós-graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

À minha família, pelo incentivo e apoio no decorrer de todos os meus estudos.

Ao Vagner, pela compreensão e paciência durante todo o desenvolvimento do trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
SUMMARY.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	4
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3.1 Fatores que influenciam a embriogênese somática em soja.....	5
3.1.1 Genótipo.....	5
3.1.2 Reguladores vegetais.....	7
3.1.3 Fonte de carbono.....	9
3.1.4 Fonte de explante.....	11
3.2 Maturação, germinação e conversão de embriões somáticos.....	12
3.3 Estudo anatômico da embriogênese somática <i>in vitro</i>	16
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1 Cultivo das plantas e obtenção dos explantes.....	21
4.2 Primeira fase do projeto.....	22
4.2.1 Condições de cultura.....	22
4.2.2 Ensaio 1.....	22
4.2.3 Ensaio 2.....	23
4.2.4 Ensaio 3.....	23
4.2.5 Ensaio 4.....	23

4.2.6 Ensaio 5.....	24
4.2.7 Ensaio 6.....	24
4.3 Segunda fase do projeto.....	26
4.3.1 Condições de cultura.....	26
4.3.2 Ensaio 1	26
4.3.3 Ensaio 2.....	27
4.4 Estudos anatômicos da embriogênese somática.....	28
4.5 Análises ultra-estruturais.....	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.1 Procedimentos de cultura de tecidos.....	29
5.1.1 Primeira fase do projeto.....	29
5.1.1.1 Ensaio 1.....	29
5.1.1.2 Ensaio 2.....	30
5.1.1.3 Ensaio 3.....	31
5.1.1.4 Ensaios 4 e 5.....	31
5.1.1.5 Ensaio 6.....	32
5.1.2 Segunda fase do projeto.....	33
5.1.2.1 Ensaio 1.....	33
5.1.2.2 Ensaio 2.....	39
5.2 Estudo anatômico e ultra-estrutural da embriogênese somática.....	39
6 CONCLUSÕES.....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
ILUSTRAÇÕES.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
BA	Benzilaminopurina
BAP	6-Benzilaminopurina
2,4-D	Ácido 2,4 - diclorofenoxiacético
GA ₃	Ácido giberélico
IAA	Ácido 3 - indolacético
IBA	Ácido indolbutírico
MCPA	Ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético
NAA	Ácido naftalenacético
2,4,5-T	Ácido 2,4,5 - triclorofenoxiacético
MSB	Meio de cultura contendo sais de MS (Murashige & Skoog, 1962) e vitaminas de B5 (Gamborg et al, 1968)
$\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	Micro Einstein por metro quadrado por segundo

ESTUDOS ANATÔMICOS DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA *in vitro* EM SOJA (*Glycine max* (L.) MERRILL)

Autora: JULIANA APARECIDA FERNANDO

Orientadora: BEATRIZ APPEZZATO-DA-GLÓRIA

RESUMO

Com o objetivo de estudar o processo embriogênico em soja, procurou-se, numa fase inicial do trabalho, estabelecer protocolos para embriogênese somática em genótipos (PI 123439, PI 165896, PI 239235, BR 8014853, BR 808858) utilizados em programas de melhoramento do Departamento de Genética da ESALQ/USP visando aumentar o teor de proteína. Nenhum destes genótipos responderam ao processo embriogênico em condições de cultura utilizando altas concentrações de 2,4-D ou outras auxinas (NAA ou 2,4,5-T). Apenas o genótipo PI 123439 respondeu ao meio MSB suplementado com 0,8 mg.L⁻¹ de 2,4-D, quando explantes cotiledonares de embriões zigóticos imaturos formaram estruturas globulares que originaram embriões somáticos. Tendo em vista que os protocolos propostos não deram resultados satisfatórios, optou-se por repetir um protocolo já descrito na literatura utilizando como controle 'Williams 82', assim como verificar o comportamento *in vitro* do genótipo PI 123439 nesse mesmo protocolo. Foram comparadas as estruturas embriogênicas obtidas neste processo com aquelas formadas na fase inicial do trabalho. Os resultados obtidos confirmaram a influência

genotípica pois, enquanto Williams 82 formou um grande número de embriões somáticos, PI 123439 apenas formou calo nas mesmas condições de cultura. A análise comparativa dos processos embriogênicos em PI 123439 e Williams 82 revelou que os embriões somáticos pré-globulares apresentaram epiderme contínua com o tecido do explante e originaram-se a partir de divisões celulares nas camadas subepidérmicas do mesofilo cotiledonar, caracterizando uma origem multicelular. O processo embriogênico ocorreu diretamente sem a intervenção de uma fase de calo. A caracterização anatômica e ultra-estrutural dos embriões somáticos obtidos mostrou a ocorrência de padrões morfológicos distintos e de embriogênese secundária.

ANATOMICAL STUDIES OF *in vitro* SOMATIC EMBRYOGENESIS OF SOYBEAN (*Glycine max* (L.) MERRILL)

Author: JULIANA APARECIDA FERNANDO

Adviser: BEATRIZ APPEZZATO-DA-GLÓRIA

SUMMARY

In order to study the embryogenesis process in soybean, it was initially tried to establish somatic embryogenesis protocols for the genotypes (PI 123439, PI 165896, PI 239235, BR 8014853, BR 808858) employed in the genetic breeding program of the Departamento de Genética from ESALQ/USP, in order to increase protein content. The tested genotypes did not show any embryogenic response under culture conditions employing high concentrations of 2,4-D and other auxins (NAA or 2,4,5-T). Only the genotype PI 123439 was able to respond to *in vitro* embryogenesis in MSB medium supplemented with 0.8 mg.L^{-1} of 2,4-D, when cotyledonary explants from immature zygotic embryos formed globular structures which originated somatic embryos. Since no satisfactory response was obtained, it was repeated a literature protocol utilizing 'Williams 82' responsive to somatic embryogenesis, and also assayed *in vitro* behaviour of genotype PI 123439 under the same culture conditions in order to evaluate the influence of the genotype on somatic embryogenesis. The embryogenic structures obtained from this protocol were compared with those

from the initial stage of this work. The results have confirmed the genotype influence, since 'Williams 82' produced a great number of somatic embryos whilst genotype PI 123439 produced only calli under these culture conditions. Comparative analysis of the embryogenic processes in PI 123439 and 'Williams 82' had shown that pre-globular somatic embryos had epidermis continuous to explant tissue and were originated from cell divisions in the sub-epidermic layers of the cotyledon mesophyll, thus characterizing multicellular origin. The embryogenic process has occurred directly without the intervention of a callus phase. Anatomical and ultrastructural characterization of the obtained somatic embryos had shown the occurrence of distinct morphological patterns and of secondary embryogenesis.

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill), espécie de grande importância econômica, teve como centro de origem o continente asiático, mais precisamente a região correspondente à China (Marcos Filho et al., 1987). A planta é anual, herbácea e pertencente à família Fabaceae.

O Brasil é o segundo maior produtor mundial. A produção prevista na safra 1998/99 é da ordem de 31,2 milhões de toneladas em uma área plantada de 12,9 milhões de hectares (Peetz, 1999).

Segundo Barwale & Widholm (1990), 8% do óleo total encontrado na soja é um ácido graxo (18:3), ácido linoléico, que é instável quando em contato com o ar e a luz, tornando o óleo de soja rançoso e de sabor alterado. Além disso, as proteínas de reserva são as determinantes primárias da composição de aminoácidos e do valor nutricional das sementes (Zarkadas et al., 1997). Portanto, caracteres relacionados com a constituição química dos grãos devem ser pesquisados de modo que a qualidade do óleo, além do teor e qualidade da proteína, sejam melhorados.

Tendo em vista a grande importância econômica da soja, existe muito interesse no desenvolvimento de estudos que gerem informações que contribuam para o melhoramento genético, tanto em programas que visam incrementos em qualidade quanto em produtividade de grãos (Thomé et al., 1995).

A cultura de tecidos constitui-se numa ferramenta para o melhoramento de plantas, quer seja pela exploração da variação somaclonal, quer pela

transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* ou via biobalística, ou ainda pela eletroporação de protoplastos (Mauro et al., 1994).

Hinchee et al. (1988) foram os primeiros a descrever o sucesso na obtenção de plantas transformadas de soja ('Peking') usando *A. tumefaciens* como vetor. Para Bond & Gresshoff (1993), a baixa frequência de transformação obtida no trabalho daqueles autores e a dificuldade de reprodutibilidade em outros laboratórios de pesquisa têm limitado a aplicação deste sistema em outros genótipos de soja, além do 'Peking'.

Uma vez que a resposta embriogênica em soja é altamente influenciada pelo genótipo, o Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Plantas, do Departamento de Genética, da ESALQ/USP, em Piracicaba, vem desenvolvendo pesquisas para o estabelecimento de protocolos que possibilitem a regeneração de plantas *in vitro* de genótipos de soja adaptados às condições tropicais e utilizados em programa de melhoramento. Neste contexto, o presente estudo procurou, numa primeira etapa, estabelecer protocolos para tais genótipos e, numa fase posterior, repetir o protocolo proposto por Parrott (1998) para a embriogênese somática em soja no cultivar Williams 82 e testar este mesmo protocolo para um dos genótipos estudados na primeira fase do projeto.

Sabe-se porém, que a resposta à transformação depende do modo como ocorre a regeneração das plantas *in vitro* (Mukhopadhyay et al., 1992; Detrez et al., 1994). Desta forma, os estudos histológicos são importantes tanto para a confirmação da via morfogênica como também para a determinação dos tipos celulares a partir dos quais surgem os embriões somáticos (Matsumoto et al., 1996).

À despeito desta importância, a caracterização histológica da embriogênese somática em soja tem sido pouco relatada na literatura (Hartweck et al.; 1988, Liu et al., 1992; Kaltchuk-Santos et al., 1997). Uma vez que, a análise da origem e desenvolvimento dos embriões somáticos poderia permitir uma intensificação ou manipulação da resposta embriogênica (Hepher

et al., 1988). Portanto, no presente estudo foram realizadas análises histológicas visando monitorar o processo embriogênico *in vitro* para genótipo PI 123439 e 'Williams 82'.

2 OBJETIVOS

Primeira fase do projeto:

- ✓ estabelecer protocolos para embriogênese somática de genótipos de soja utilizados em um programa de melhoramento, visando alto teor de proteína, do Departamento de Genética da ESALQ/USP;
- ✓ analisar a estrutura anatômica dos embriões somáticos obtidos a partir destes protocolos.

Segunda fase do projeto:

- ✓ repetir o protocolo proposto por Parrott (1998) para embriogênese somática em soja utilizando como controle 'Williams 82', estudado pelo autor;
- ✓ testar o protocolo proposto por Parrott (1998) utilizando o genótipo PI 123439, que foi estudado na primeira fase do projeto, visando verificar a resposta deste genótipo à embriogênese somática;
- ✓ monitorar, através de análises anatômicas, a embriogênese somática obtida a partir do protocolo e genótipo estudados por Parrott (1998) com a finalidade de comparar os embriões somáticos obtidos neste processo com aqueles esporadicamente formados nos protocolos usados na primeira fase do projeto.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Fatores que influenciam a embriogênese somática em soja

3.1.1 Genótipo

O sucesso na indução de embriões somáticos e a possível conversão em plantas férteis não são uma rotina ou um processo eficiente para uma grande maioria das espécies (Merkle et al., 1995). Dentro desse contexto, o cultivo de soja *in vitro* via embriogênese somática ainda possui limitações, principalmente quanto ao genótipo com o qual se deseja trabalhar. Segundo Shoemaker et al. (1991), o genótipo afeta tanto a frequência quanto a formação de embriões somáticos. Dessa maneira, pode-se dizer que o sucesso dessa via de regeneração é genótipo-dependente.

Komatsuda & Ohyama (1988) observaram que a capacidade embriogênica foi altamente influenciada pelos genótipos e sugeriram que parentais selvagens de soja, especialmente *Glycine canescens*, preservaram alta competência para regeneração de plantas *in vitro*. Komatsuda et al. (1992) obtiveram 77% de germinação de embriões somáticos em *G. gracilis*, enquanto para *G. max* ('American Yellow' e 'Viking') tiveram cerca de 60-64% de germinação. De maneira similar, Bailey et al. (1993) relataram que o genótipo PI 417138 (classificado como *G. gracilis*), uma variedade semi-selvagem e, portanto, com pouco valor agrônômico, demonstrou maior capacidade de regeneração de embriões somáticos em relação aos cultivares Century e

Peking. Genótipos semi-selvagens porém, sexualmente compatíveis com culturas melhoradas como *G. max*, poderiam ser apropriados como fonte de introgressão de genes em linhagens elite com baixo rendimento para produção de embriões somáticos.

Parrott et al. (1989) estudaram 33 linhagens de soja e indicaram 'Manchu' e 'A.K. Harrow' como tendo alta capacidade para regeneração a partir de embriões somáticos, sendo que os demais genótipos com essa habilidade possuíam estes dois genótipos na sua formação. Entretanto, 'Pennyryle' e 'Wayne' foram considerados com baixa capacidade de regeneração apesar de terem 'Manchu' como ancestral.

Mauro et al. (1994) relataram que as linhagens F_5 , originárias de cruzamentos entre 'Peking' e 'Clark', superaram os seus progenitores na produção de embriões somáticos.

Tian et al. (1994) também demonstraram que a produção de embriões somáticos foi dependente do genótipo, obtendo respostas variando entre 18 e 98%. Segundo os autores, três linhagens ancestrais ('840-7-3', 'A.K. Harrow' e 'Mandarin') mostraram alta taxa de embriogênese somática. De maneira similar, estudos realizados com outros cultivares comerciais de soja (*G. max*) indicaram a dependência genotípica quanto à eficiência e ao rendimento de embriões somáticos, sendo a porcentagem de resposta dos explantes cotiledonares ao processo de indução 89% e 26% em 'Bay' e 'Peking', respectivamente (Li & Grabau, 1996).

Mauro et al. (1996) observaram que, entre 12 genótipos brasileiros avaliados, '844-04' e 'IAS-5' apresentaram as melhores respostas para embriogênese somática em que o número total de embriões somáticos formados para cada genótipo em 40 explantes foi 157 e 100, respectivamente.

As diferenças observadas quanto à capacidade para embriogênese somática para diferentes genótipos deve-se à interação de genes que controlam a regeneração com o protocolo utilizado, além de fatores como

estado fisiológico e de desenvolvimento do explante (Chengalrayan et al., 1998).

3.1.2 Reguladores vegetais

O tipo de regulador vegetal bem como as concentrações utilizadas são certamente aspectos importantes no processo de embriogênese somática. Isto se justifica por se tratar de um fator que altera tanto a frequência de resposta quanto a morfologia externa dos embriões somáticos (Calvo, 1989).

De modo geral, auxinas e citocininas são consideradas as duas classes de reguladores vegetais mais importantes para a regulação do crescimento e desenvolvimento organizado em cultura de tecidos (Gaspar et al., 1996). Especificamente quanto ao processo de embriogênese somática *in vitro*, as auxinas desempenham papel essencial na indução do embrião somático em cultura e no posterior desenvolvimento desse embrião (Zimmerman, 1993).

Parrott et al. (1995) relataram que as auxinas são os reguladores vegetais mais utilizados na embriogênese somática ressaltando que em soja esse processo responde satisfatoriamente tanto na presença de 2,4-D quanto NAA. Segundo Hartweck et al. (1988), NAA induziu embriões somáticos no perímetro distal dos explantes cotiledonares, enquanto que o 2,4-D induziu a formação desses embriões ao longo de toda a superfície do explante cotiledonar.

Alguns dos primeiros estudos, visando a obtenção de embriões somáticos de soja, relataram o uso de baixos níveis de auxinas, principalmente em relação ao 2,4-D. Da mesma forma, combinações de auxinas e citocininas também foram testadas quanto a esse processo embriogênico *in vitro*, porém algumas leguminosas, como a soja, não têm respondido aos tratamentos convencionais de auxina-citocinina (Parrott et al., 1995).

Lippmann & Lippmann (1984) avaliaram a resposta do tecido cotiledonar de embriões zigóticos imaturos de soja em meio suplementado com diferentes

tipos de auxinas (2,4-D, MCPA, 2,4,5-T, NAA, IAA, IBA) sob diferentes concentrações. Os autores observaram que a maior taxa de embriões somáticos formados foi no meio de cultura suplementado $1,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D. Por outro lado, a adição de citocininas (BA, zeatina e cinetina) nos meios de cultura contendo 2,4-D inibiram a formação de tecidos meristemáticos e de embriões somáticos nos explantes cotiledonares. Os autores concluíram que a formação de embriões somáticos e tecido meristemático dependeu do tipo e da concentração de auxina. Para indução de embriões somáticos a partir de embriões zigóticos imaturos de soja, Komatsuda & Ohyama (1988) testaram $10,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de NAA, $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D e a combinação $10,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de NAA e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de BA. A partir da avaliação de 26 genótipos, os pesquisadores observaram que embriões somáticos anormais foram obtidos tanto em meio de cultura contendo $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D como $10,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de NAA. Entretanto, a combinação $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de BA e $10,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de NAA geraram um calo compacto, porém, a embriogênese foi altamente reduzida.

Ranch et al. (1985), utilizando baixos níveis de auxina para obtenção de embriões somáticos de soja, observaram que explantes mantidos sob a concentração de $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D produziram embriões somáticos morfológicamente anormais sem capacidade de regeneração. Porém, na concentração de $10,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D os embriões apresentaram-se morfológicamente normais.

Lazzeri et al. (1987a) também avaliaram a resposta embriogênica em genótipos de soja na presença de 2,4-D e NAA. Considerando-se a eficiência embriogênica, o meio de cultura suplementado com 2,4-D produziu maior número de embriões somáticos enquanto que, para a obtenção de grande número de embriões somáticos em meio suplementado com NAA, maiores concentrações dessa auxina tiveram que ser adicionadas. Os autores também evidenciaram que o tipo de auxina afetava a morfologia do embrião somático: embriões induzidos por NAA exibiram bipolaridade com regiões radicular e hipocotiledonar distintas, cotilédones bem definidos e ápice caulinar visível;

embriões induzidos por 2,4-D apresentaram cotilédones fusionados e ápice caulinar não desenvolvido (Lazzeri et al., 1987b).

Segundo Shoemaker et al. (1991), a frequência e a qualidade da resposta embriogênica a partir de cotilédones imaturos de soja variaram com a concentração de 2,4-D: os efeitos teratogênicos sobre a morfologia e desenvolvimento do embrião diminuíram com o aumento da concentração desse regulador vegetal. Bodanese-Zanettini et al. (1993) também sugeriram que para incrementar as taxas de indução de embriões somáticos e a produção de plântulas era necessário o aumento da concentração de 2,4-D no estágio de indução.

Liu et al. (1992) utilizaram a concentração de $40,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D para indução de embriões somáticos em 'Fayette' e 'J103'. De maneira similar, Bailey et al. (1993) avaliando a resposta embriogênica em 'Peking', 'Williams 82' e genótipo PI 417138 também utilizaram a mesma concentração no meio de indução.

Importante ressaltar que, em estudos mais recentes do processo de embriogênese somática em genótipos de soja (Li & Grabau, 1996; Santarem et al., 1997), a utilização de altos níveis de 2,4-D em meio de cultura para indução de embriões somáticos tem sido uma prática rotineira.

3.1.3 Fonte de carbono

Segundo Lippman & Lippman (1984), a embriogênese somática em soja parece ser muito sensível a altas concentrações de açúcar no meio de cultura. Os autores observaram que não se formaram embriões somáticos em meio contendo sacarose acima de 2% ou glicose acima de 1,5%. Do mesmo modo, Komatsuda et al. (1991) relataram que o meio de cultura suplementado com 0,5% ou 1% de sacarose produziram um maior número de embriões somáticos que o meio de cultura contendo 2% ou 3% do mesmo açúcar. Os autores

evidenciaram que a interação genótipo-sacarose foi altamente significativa para a embriogênese somática em *G. max*.

Lazzeri et al. (1987b) também relataram que a eficiência da embriogênese somática declinou com o aumento da concentração de açúcar. Para sacarose, a frequência de embriogênese somática foi maior na concentração de 3%, menor a 6% e embriões não foram observados na concentração de 12%; para glicose, a frequência mais alta de embriogênese foi obtida na concentração de 1,5% com diminuição da produção a 3 e 6%. Tanto sacarose quanto glicose mostraram resposta satisfatória até 6% de concentração.

Ferreira et al. (1990) relataram que a concentração da fonte de carbono podia acarretar diferenças morfológicas aos embriões somáticos. Komatsuda et al. (1991) observaram que 1% de sacarose resultou em embriões com hipocótilo e cotilédones definidos. Por outro lado, 3% do mesmo açúcar levou à formação de embriões menos definidos. Entretanto, estudos mais recentes revelaram que a concentração de 3% de sacarose foi mais efetiva no processo de indução da embriogênese somática (Parrott, 1998).

O suprimento de carboidrato durante a maturação do embrião somático também é importante para a qualidade e o número de embriões somáticos (Merkle et al., 1995). Segundo Komatsuda (1995), a maturação de embriões somáticos requer um aumento na concentração de sacarose de 3 para 6%. Os autores relataram que maiores concentrações de sacarose aceleram o aumento de massa da matéria fresca e o acúmulo de proteínas de reserva.

Bodanese-Zanettini et al. (1993) também utilizaram alta concentração de sacarose (10%) em meio MS para maturação de embriões somáticos de *G. max*. Komatsuda et al. (1992) relataram que o melhor tratamento para maturação de embriões somáticos de *G. max* foi a permanência desses embriões por um período de duas semanas em meio de cultura contendo 6% de sacarose. Durante esse período os embriões tornaram-se amarelos.

Um dos protocolos mais recentes para obtenção de embriogênese somática em soja estabelece o uso de 3% de sacarose em meio de indução de embriões somáticos e 6% de maltose para maturação desses embriões somáticos (Parrott, 1998).

3.1.4 Fonte de explante

A fonte de explante é um dos fatores que exerce influência sobre a resposta embriogênica. Segundo Parrott et al. (1995), para espécies de leguminosas que formam embriões somáticos a partir de calos a escolha do explante é menos crítica, podendo consistir de fragmentos foliares, hipocótilos, etc. Entretanto, o sucesso da regeneração de plantas via embriogênese somática em soja tem sido obtido a partir de cotilédones de embriões zigóticos imaturos (Liu et al., 1992).

Merkle et al. (1995) relataram que para soja a orientação do explante em meio de cultura teve grande importância, sendo que o maior número de embriões somáticos formados ocorreu quando os cotilédones foram colocados com a superfície abaxial em contato com o meio de cultura. Mauro et al. (1994), ao avaliarem a posição do explante em diferentes genótipos de soja, também observaram que os cotilédones imaturos posicionados com a superfície abaxial em contato com o meio de cultura formaram maior número de embriões somáticos que nos cotilédones posicionados com a superfície adaxial em contato com o meio (Mauro et al., 1994).

Hepher et al. (1988) consideraram que a diferença na resposta embriogênica entre a epiderme das faces abaxial e adaxial é uma consequência, não da ontogênese, mas sim do estado metabólico relacionado à função: o potencial embriogênico da epiderme da face abaxial está associado com seu papel como tecido de transferência de nutrientes. Os autores relataram que análises ultra-estruturais das células da epiderme da face abaxial confirmaram sua natureza extremamente ativa: as células

apresentaram núcleos grandes e citoplasma denso com numerosas conexões citoplasmáticas via plasmodesmos. Por outro lado, as células da epiderme da face adaxial tiveram uma redução aparente no nível de atividade, apresentando-se altamente vacuolizadas.

Assim como a orientação, o tamanho do explante também deve ser considerado para o sucesso no processo de embriogênese somática em soja. Lippmann & Lippmann (1984) demonstraram que a formação de embriões somáticos dependeu do estágio de desenvolvimento dos embriões zigóticos imaturos utilizados como fonte de explante, sendo 4 a 5 mm de comprimento os explantes mais efetivos para o processo. Ranch et al. (1985) determinaram que as maiores frequências embriogênicas foram obtidas a partir de cotilédones com 0,5 a 4 mm de comprimento. De maneira similar, Hepher et al. (1988) também consideraram cotilédones com 3 mm mais efetivos que cotilédones apresentando 6 mm de comprimento.

Alguns estudos revelaram que o seccionamento do explante cotiledonar exerceu influência na resposta embriogênica. Lazzeri et al. (1987b) verificaram que cotilédones imaturos de embriões zigóticos de *G. max* divididos ao meio ou em até quatro partes tenderam a aumentar o número de embriões somáticos obtendo frequências de 34 e 38%, respectivamente, enquanto que em explantes intactos a frequência de embriões somáticos foi de 9%. Similarmente, Nadolska-Orczyk & Orczyk (1994) seccionaram explantes cotiledonares de diferentes genótipos de *G. max* em três partes observando que o número de embriões somáticos foi maior nos cotilédones seccionados.

3.2 Maturação, germinação e conversão de embriões somáticos

Após o período de indução do estado embriogênico, tem início um processo de intensa divisão celular caracterizado como histodiferenciação. Neste processo, para algumas espécies como soja, é necessário suprimir a auxina do meio de cultura enquanto que, para outras espécies, diminuir a

concentração desse regulador vegetal é condição suficiente para o desenvolvimento do embrião somático (Parrott et al., 1995). Os processos de maturação, germinação e conversão de embriões somáticos, que são processos fisiológicos distintos e que requerem diferentes condições de cultura (Calvo, 1989) ocorrem após esse estágio de histodiferenciação.

A maturação é marcada pela expansão celular e acúmulo de reservas, sendo que o tempo necessário para que os embriões somáticos alcancem a maturidade fisiológica é espécie-específico (Parrott et al., 1995).

Importante evidenciar que o processo de germinação refere-se ao desenvolvimento de raízes e/ou caules e conversão define-se como o desenvolvimento e sobrevivência das plântulas obtidas em condições ambientais *ex vitro* (Merkle et al., 1995).

Os embriões somáticos atingem a maturidade quando são submetidos a meios de cultura específicos que permitem a simulação do processo de maturação *in vivo*. Normalmente, inibidores de crescimento, como o ABA, são utilizados para auxiliar tanto no processo de maturação quanto no de conversão de embriões somáticos (Santarém, 1992). Auxinas em baixas concentrações, como IBA, e uma ou mais citocininas também são utilizadas para o sucesso destes processos (Calvo, 1989). Segundo Parrott et al. (1995), auxinas, citocininas e ABA são necessários durante a embriogênese para iniciar a síntese de proteínas de reserva e de proteínas envolvidas na tolerância à dessecação.

Ranch et al. (1985) adicionaram ABA ($0,26 \text{ mg.L}^{-1}$) e IBA ($0,12 \text{ mg.L}^{-1}$) ao meio de cultura e observaram aumento na frequência de maturação dos embriões somáticos de soja. Entretanto, a permanência dos embriões somáticos por longos períodos de tempo na presença de ABA resultou num decréscimo na frequência de germinação.

Ferreira et al. (1990) utilizaram, na fase de maturação de embriões somáticos de 'IAS-5' e 'Ivorá', somente o meio B5 suplementado com $0,12 \text{ mg.L}^{-1}$ de IBA e $0,13 \text{ mg.L}^{-1}$ de ABA, enquanto que para a conversão em

plântulas, utilizaram $0,12 \text{ mg.L}^{-1}$ de IBA e $0,10 \text{ mg.L}^{-1}$ de GA_3 , obtendo como porcentagem de conversão 75 e 40%, respectivamente. Similarmente, Christou & Yang (1989) também utilizaram, no processo de conversão de embriões somáticos em plântulas, o meio MS suplementado com GA_3 ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$) e IBA ($1,2 \text{ mg.L}^{-1}$).

Por outro lado, Bodanese-Zanettini et al. (1993) observaram que 'IAS-5' e 'COBB' apresentaram 44,9 e 90,9% de conversão em plântulas, respectivamente, não tendo sido utilizados reguladores vegetais nas fases de maturação e conversão. Segundo os autores, a omissão de reguladores vegetais nas fases posteriores à indução reduziu a frequência de mutações genéticas.

Komatsuda & Ohyama (1988) relataram que o tipo de auxina que suplementa o meio de indução afetou fortemente o desenvolvimento do embrião somático na maturação. Os autores observaram que a indução em meio contendo NAA proporcionou uma germinação superior em relação aos embriões somáticos induzidos com 2,4-D. Buchheim et al. (1989) utilizaram 2,4-D no meio de indução e observaram que na fase de maturação foi requerida a presença de carvão-ativado para diminuir os efeitos do regulador vegetal ministrado anteriormente. Isso porque, o carvão-ativado tem a propriedade de adsorver o 2,4-D e compostos aromáticos produzidos pelos tecidos e que são inibidores do crescimento e desenvolvimento. Similarmente, Dahmer et al. (1991) também observaram que a germinação foi mais eficiente após transferir os embriões para um meio de maturação com baixa concentração ou ausência de auxina.

O processo de dessecação tem sido eficiente para o sucesso na conversão de embriões somáticos de soja em plântulas. Sabe-se que nos embriões zigóticos de leguminosas a maturidade fisiológica é seguida por um período de dessecação o qual tem sido relacionado com a síntese de proteínas e a habilidade para germinar (Parrott et al., 1995). Tal processo pode ser induzido em condições de cultura *in vitro*.

Hammatt & Davey (1987) obtiveram aumento de 35 e 72%, respectivamente, nas taxas de germinação de embriões somáticos de 'Mitchell' e 'AP120' após terem submetido os embriões a um período de dessecação. Os autores transferiram os embriões somáticos do meio de maturação (B5, 2% de sacarose, 0,1 mg.L⁻¹ de IBA) para placas de Petri desprovidas de meio de cultura onde permaneceram por período de uma a quatro semanas. Os embriões somáticos transferidos para meio de germinação, sem um período de dessecação, tiveram menos de 5% dos embriões apresentando raiz e caule. De maneira similar, Parrott (1998) também observou, em genótipos de soja, a necessidade de um período de dessecação de 3 a 7 dias dependendo do genótipo.

Embora a eficiência de conversão de embriões somáticos em plântulas tenha sido confirmada por diversos métodos, é importante evidenciar que o processo é altamente influenciado pela morfologia desses embriões. Embriões somáticos morfológicamente normais germinam e se convertem em plântulas rapidamente enquanto que embriões anormais requerem períodos mais longos de incubação ou manipulação da cultura (Lazzeri et al., 1987a).

Buchheim et al. (1989) avaliaram a porcentagem de conversão de embriões somáticos de *G. max.* e observaram que, para culturas contendo embriões somáticos com cotilédones fusionados e embriões fasciados, a porcentagem de conversão foi inferior a 35%. Por outro lado, culturas que incluíam embriões monocotiledonares, dicotiledonares, multicotiledonares, embriões moderadamente fasciados apresentaram uma frequência de 70% ou mais. Os mesmos autores ressaltaram que os embriões somáticos que não converteram produziram um sistema radicular mais desenvolvido que aqueles que foram capazes de formar plantas. Similarmente, Suhasini et al. (1996) observaram em *Cicer arietinum* que embriões somáticos que não converteram em plântulas apresentaram maior número de raízes, sendo que a porcentagem de conversão de embriões fasciados foi de 0%.

3.3 Estudo anatômico da embriogênese somática *in vitro*

Embriogênese somática é o processo pelo qual células somáticas haplóides ou diplóides se desenvolvem em plantas diferenciadas passando por estágios embriológicos distintos sem que ocorra a fusão de gametas (Williams & Maheswaram, 1986). O embrião formado denomina-se embrião somático.

A embriogênese somática *in vitro* tornou-se um modelo potencial para o estudo de eventos regulatórios e morfogenéticos em embriogênese de plantas (Zimmerman, 1993). A similaridade dessa via de regeneração *in vitro* com a embriogênese zigótica fornece muitas vantagens como a presença de meristemas apicais caulinares e radiculares na mesma unidade, produção de um grande número de embriões, produção de sementes sintéticas, resgate de embriões, etc. (Ammirato, 1987).

Zimmerman (1993) destaca que o desenvolvimento de marcadores moleculares para estudos de eventos relacionados à diferenciação de células e tecidos são essenciais para o entendimento das mutações observadas nos embriões. Além disso, a embriogênese somática também é uma via capaz de induzir variabilidade e auxiliar nos processos de transformação de plantas.

Existem dois tipos de processos que podem produzir embriões somáticos: 1) embriogênese direta, na qual os embriões se originam diretamente do explante, sem a proliferação de calos; 2) embriogênese indireta, na qual o calo é formado, mantido e proliferado antes do desenvolvimento dos embriões somáticos (Santarém, 1992).

Williams & Maheswaran (1986) sugeriram que a embriogênese somática direta é precedida por células pré-embriogênicas determinadas (PEDC's), requerendo somente reguladores de crescimento ou condições favoráveis para o início da divisão celular e a expressão da embriogênese. Por outro lado, o termo célula embriogênica determinada induzida (IEDC's) é usado para identificar células capazes de adquirir o potencial embriogênico durante o período de cultivo. Neste caso, a embriogênese indireta requer a

redeterminação de células diferenciadas, a proliferação de calos e o desenvolvimento do estado embriogenicamente determinado.

Parrott et al. (1995) mencionaram que a exposição a hormônios é um dos mecanismos que influenciam a resposta embriogênica. Lazzeri et al. (1985) relataram a formação de embriões somáticos de *G. max* em resposta às auxinas e que estes regeneraram diretamente sem uma fase de calo. De maneira similar, estudos histológicos da embriogênese somática de *Trifolium repens* obtida a partir de embriões zigóticos imaturos cultivados na presença de $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP demonstraram que células da epiderme do hipocótilo proliferaram produzindo embriões somáticos diretamente, sem a intervenção de uma fase de calo (Maheswaran & Williams, 1985). Yuqing et al. (1995) também observaram a formação de estruturas embriogênicas originando-se diretamente dos explantes, sem qualquer intervenção de uma fase de calo em meio de cultura contendo $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e $0,04 \text{ mg.L}^{-1}$ de NAA. Entretanto, em uma mesma cultura, é possível verificar tanto embriogênese somática direta como indireta. Segundo Santos et al. (1983), a origem dos embriões somáticos em meio de cultura suplementado com $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D e $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de cinetina ocorreu a partir de células epidérmicas únicas de cotilédones, hipocótilos e raízes de plântulas induzidas bem como, a partir de calos friáveis de *Medicago sativa* L. Fernando (1996), utilizando $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D, também verificou em *Carica papaya* L. a formação de embriões somáticos diretamente a partir de células únicas da epiderme hipocotiledonar do explante e indiretamente a partir de células superficiais de complexos pré-embriônicos presentes nas camadas periféricas e internas do calo.

O papel das auxinas no processo de embriogênese somática não é muito claro e, segundo Parrott et al. (1995), a metilação do DNA, que pode alterar programas de expressão gênica, ocorre na presença desses reguladores. Os mesmos autores evidenciaram que as células podem se isolar das adjacentes pelo rompimento de plasmodesmos ou pela necrose do tecido,

interrompendo as interações célula à célula as quais podem reforçar a expressão de um programa de desenvolvimento embriogênico.

Hartweck et al. (1988) ressaltaram que tratamentos com auxinas ocasionaram diferentes padrões de divisão celular: a) células únicas ou grupos de células dividindo-se para formar embriões diretamente; b) divisões celulares formando grupos embriogênicos que posteriormente formavam embriões; c) células formando zonas meristemáticas não-embriogênicas. Estas últimas encontravam-se associadas ao tecido vascular formando fileiras lineares de pequenas células homogêneas com núcleos grandes. As divisões continuadas nestas regiões formaram protrusões sobre a superfície do explante e convoluções marginais organizando raízes e estruturas neomorfas freqüentemente com diferenciação de elementos traqueais. Anteriormente, Handro et al. (1973) já haviam relatado que a formação de raízes em *Petunia inflata* em meio suplementado com $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D foi precedida pelo desenvolvimento de um meristema periférico o qual apresentou grupos de células com citoplasma denso e núcleo proeminente.

Estudos realizados por Liu et al. (1992) em *G. max* ('Fayette' e 'J103') indicaram que a origem de embriões somáticos ou tecidos embriogênicos pode ser determinada pela concentração de 2,4-D aplicada ao meio de indução, assim como pelas diferentes fontes doadoras de explantes. Os autores observaram que, embriões somáticos formados a partir de explantes embrionários de origem somática cultivados na presença de $40,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D, tiveram origem unicelular a partir de células epidérmicas sem a intervenção de uma fase de calo. Por outro lado, Hartweck et al. (1988), utilizando cotilédones de embriões zigóticos imaturos como explantes sob a concentração de $25,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D, observaram formação multicelular dos embriões somáticos. Similarmente, Dornelas et al. (1992) sugeriram uma origem multicelular dos embriões somáticos de *Stylosanthes scabra* a partir de explantes cotiledonares cultivados em meio de cultura contendo $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D.

Tendo em vista que as auxinas estão relacionadas com a polaridade das células embriogênicas, Liu et al. (1993) concluíram que o transporte polar das auxinas desempenha um importante papel na formação dos cotilédones durante o desenvolvimento dos embriões e que a interferência nesse transporte ocasiona deficiências na transição da simetria axial para a bilateral, resultando na formação de embriões com cotilédones fusionados.

Segundo Rodriguez & Wetzstein (1994), a indução de embriões somáticos de *Carya illinoensis* a partir de embriões zigóticos imaturos em meio de cultura suplementado com 2,0; 6,0 e 12,0 mg.L⁻¹ de NAA ou 2,4-D, formaram embriões somáticos diferindo quanto ao ápice caulinar e a morfologia dos cotilédones. Em culturas induzidas com NAA, exibiram 34-41% dos embriões somáticos com bipolaridade e ápice caulinar e cotilédones bem definidos, porém culturas induzidas com 2,4-D apresentaram 69-84% dos embriões com ápice caulinar reduzido ou ausente. Dessa forma, as autoras concluíram que a fonte de auxina afetou a frequência e a morfologia dos embriões somáticos. Rodriguez & Wetzstein (1998) também relataram uma maior diversidade morfológica de embriões somáticos em culturas induzidas com 2,4-D.

Buchheim et al. (1989) classificaram diferentes tipos morfológicos de embriões somáticos de *G. max*: monocotiledonares, dicotiledonares, multicotiledonares, cotilédones fusionados, trombeta, cotilédone vestigial associado a hipocótilo longo e embriões fasciados. Suhasini et al. (1996), utilizando como fonte de auxina o 2,4,5-T, também adotaram para os embriões somáticos obtidos de *Cicer arietinum* procedimento de classificação similar. Os autores evidenciaram que a ausência de um meristema apical caulinar é um fator vital que contribui para que esses embriões aberrantes percam a capacidade de conversão em plantas.

A formação de morfologias divergentes em embriões somáticos também foram relatadas por Wetzstein & Baker (1993) em *Arachis hypogaea*: embriões somáticos com formato trombeta apresentaram região apical caulinar pouco

definida em que as células mitóticas foram restritas a poucas camadas sem uma área apical delimitada e os embriões fusionados exibiram múltiplas áreas meristemáticas. Estudos recentes realizados por Passos et al. (1999) revelaram a formação de embriões somáticos gigantes em *Vitis* spp. Estes embriões apresentaram cotilédones múltiplos, ausência de um meristema apical caulinar e formação de vários embriões secundários na porção localizada entre o hipocótilo e a região radicular.

Segundo Buchheim et al. (1989), as variações morfológicas encontradas nos embriões somáticos podem ser úteis para avaliar a dimensão desses distúrbios sem que afetem os eventos de desenvolvimento. Em certos estágios, durante o desenvolvimento do embrião zigótico de soja, sabe-se que os cotilédones possuem maior quantidade de ABA que o eixo hipocótilo-radícula. A relação da quantidade de material cotiledonar e a razão de conversão indicaram que os cotilédones possuem uma influência regulatória sobre a dormência e a conversão dos embriões somáticos de soja. Essa influência pode ser atribuída ao conteúdo de ABA nos cotilédones.

A assincronia do processo de embriogênese somática também pode ser observada para diferentes culturas. Segundo Rodriguez & Wetzstein (1994), o sistema de embriogênese somática em *Carya illinoensis* apresentou-se de maneira assincrônica, ocorrendo simultaneamente, em cultura, embriões em vários estágios de desenvolvimento. Dornelas et al. (1992) também relataram assincronia na formação de embriões somáticos de *Stylosanthes scabra* onde estruturas globulares puderam ser observadas juntamente com estágios mais avançados de desenvolvimento dos embriões somáticos. De maneira similar, Passos et al. (1999) observaram em *Vitis* spp. assincronia do processo embriogênico bem como embriões somáticos primários exibindo embriões secundários na região de contato entre o hipocótilo e a radícula. Segundo Ammirato (1987), o processo de embriogênese somática *in vitro* é altamente repetitivo sendo esta uma das causas da assincronia verificada na maioria das culturas analisadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivo das plantas e obtenção dos explantes

Sementes dos genótipos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) PI 123439, PI 165896, PI 239235, BR 8014853, BR 808858, e sementes de 'Williams 82', utilizado como genótipo controle, foram semeadas em vasos de barro, com capacidade de 5 litros e mantidos sob telado de sombrite. Durante todo o ensaio, foram efetuadas freqüentes pulverizações visando o controle das infestações por ácaros, fungos, mosca branca e outros agentes patogênicos.

Para a obtenção dos explantes, vagens imaturas foram coletadas cerca de 21 dias após o florescimento das plantas e desinfestadas por imersão em álcool 70% (v/v) por 40 segundos e em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 1% (v/v) por um período de 15 minutos, sendo posteriormente lavadas 4 vezes em água destilada deionizada esterilizada.

Embriões zigóticos imaturos, não ultrapassando 5 mm de comprimento, foram assepticamente removidos das vagens tendo o eixo embrionário excisado e os cotilédones inoculados com a face abaxial em contato com o meio de cultura.

4.2 Primeira fase do projeto

4.2.1 Condições de cultura

Nesta primeira fase do trabalho, os embriões zigóticos imaturos dos genótipos PI 123439, PI 165896, PI 239235, BR 8014853 e BR 808858 foram removidos assepticamente das vagens, tiveram o eixo embrionário excisado e os cotilédones seccionados longitudinalmente (Lazzeri et al., 1987b; Nadolska-Orczyk & Orczyk, 1994).

O meio de cultura básico utilizado para indução do processo embriogênico foi MSB: sais de MS (Murashige & Skoog, 1962) e vitaminas de B5 (Gamborg et al., 1968), utilizando 0,2% de Phytigel como agente gelificante. O meio de cultura foi autoclavado a 120 °C, a 1 atm por 20 minutos. Após a inoculação dos explantes, as culturas foram mantidas em sala de crescimento sob a temperatura de 25 ± 2 °C e 16 horas de fotoperíodo, luz branca fria e radiação luminosa de $30 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Informações sobre os ensaios, descritos a seguir, encontram-se sumarizadas no Quadro 1.

4.2.2 Ensaio 1

O objetivo deste ensaio foi testar protocolos de embriogênese somática já definidos na literatura para dois genótipos de interesse: PI 123439 e BR 8014853. A escolha da fonte de auxina e das concentrações foi baseada em protocolos que utilizaram baixas concentrações da auxina 2,4-D: $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ e $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ (Ranch et al., 1985; Lazzeri et al., 1987a,b; Komatsuda & Ohyama, 1988). A concentração $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D foi igualmente utilizada. Utilizou-se a concentração de 3% de sacarose.

O número de repetições por tratamento foi igual a 12, sendo os explantes distribuídos em três frascos contendo quatro explantes. A avaliação foi feita com base no número de protuberâncias por explante, número de embriões por explante e massa da matéria fresca dos calos.

As avaliações foram realizadas ao 14º e 28º dia após inoculação.

4.2.3 Ensaio 2

Em função do baixo número de embriões somáticos formados no ensaio 1, este segundo ensaio teve por objetivo testar outra fonte de auxina para os genótipos PI 123439 e BR 8014853. O protocolo de indução de embriões somáticos foi baseado em Komatsuda et al. (1992) que utilizaram $10,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de NAA e 0,5% de sacarose. Também foram usadas outras duas concentrações de sacarose: 0,1% e 2,5%.

O número de repetições por tratamento foi igual a 20, sendo os explantes distribuídos em cinco frascos com quatro explantes.

4.2.4 Ensaio 3

Este ensaio teve como propósito avaliar a resposta embriogênica dos genótipos PI 123439 e BR 8014853 à auxina 2,4,5-T (Calvo, 1989) sob as diferentes concentrações de sacarose, utilizadas no ensaio anterior (item 4.2.3)

O número de repetições por tratamento foi igual a 28, sendo os explantes distribuídos em sete frascos contendo quatro explantes.

4.2.5 Ensaio 4

Tendo em vista a eficiência do protocolo de Kluge & Bodanese-Zanettini (1997), que utilizaram $40,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D, este ensaio visou avaliar várias

concentrações dessa auxina (10,0; 20,0; 40,0 e 60,0 mg.L⁻¹) para o genótipo PI 123439. Utilizou-se 6% de sacarose como fonte de carbono.

O número de repetições por tratamento foi igual a 28, sendo os explantes distribuídos em sete frascos contendo quatro explantes.

4.2.6 Ensaio 5

Nos ensaios anteriores, foram utilizados frascos como recipientes, porém alguns autores (Lazzeri et al., 1987a,b; Bodanese - Zanettini et al., 1993; Li & Grabau, 1996; Parrott, 1998) conduziram seus experimentos em placas de Petri, assim como Kluge¹. Dessa maneira, o presente ensaio teve por objetivo testar o recipiente sugerido pelos protocolos supracitados para os genótipos PI 123439 e BR 8014853. Utilizou-se 40,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 6% de sacarose.

O número de repetições para o genótipo PI 123439 foi igual a 40, sendo os explantes distribuídos em quatro placas. Para o genótipo BR 8014853, o número de repetições foi igual a 20, sendo os explantes distribuídos em duas placas. Em cada placa foram distribuídos dez explantes.

4.2.7 Ensaio 6

Em função dos resultados negativos obtidos nos ensaios anteriores, outros genótipos foram avaliados: PI 165896, PI 239235 e BR 808858, além do genótipo PI 123439. Utilizou-se três diferentes concentrações de 2,4-D (0,8; 20,0 e 40,0 mg.L⁻¹) e 3% de sacarose.

O número de repetições por tratamento foi igual a 42, sendo os explantes distribuídos em seis placas contendo sete explantes.

As culturas foram acompanhadas semanalmente e após 30 dias foram avaliadas quanto ao número de embriões por explante.

Kluge, M.L. Comunicação pessoal, 1997.

Quadro 1. Sumário dos ensaios 1 a 6 referente aos genótipos, fitorreguladores, concentrações de sacarose, pH e recipiente utilizados.

Ensaio	Genótipos	Fitorreguladores (mg.L ⁻¹)	Sacarose	pH	Recipiente
1	PI 123439 BR 8014853	2,4-D (0,8; 2,0 e 5,0)	3%	5,8	frasco (10 x 5 cm) 30 mL
2	PI 123439 BR 8014853	NAA (10,0)	0,1%; 0,5 e 2,5%	5,8	frasco (10x 5 cm) 30 mL
3	PI 123439 BR 8014853	2,4,5-T (11,5)	0,1%; 0,5% e 2,5%	5,8	frasco (10x 5 cm) 30 mL
4	PI 123439	2,4-D (10,0; 20,0; 40,0 e 60,0)	6%	5,8	frasco (10 x 5 cm) 30 mL
5	PI 123439 BR 8014853	2,4-D (40,0)	6%	7,0	placa (1,5x10cm) 20 mL
6	PI 123439, PI 165896, PI 239235, BR 808858	2,4-D (0,8; 20,0 e 40,0)	3%	5,8	placa (1,5x10cm) 20 mL

4.3 Segunda fase do projeto

4.3.1 Condições de cultura

Embriões zigóticos imaturos do genótipo PI 123439 e 'Williams 82' foram removidos assepticamente das vagens tendo o eixo embrionário excisado, porém os cotilédones não foram seccionados longitudinalmente.

Os explantes foram inoculados em placas de Petri de plástico (1,5 x 10 cm), seladas com Parafilm (American National Can). Foram inoculados dez explantes por placa tendo sido usadas quatro repetições.

Nas fases de indução e histodiferenciação, as culturas foram mantidas sob radiação luminosa de 5 a 8 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Parrott, 1998). Entretanto, nas fases de maturação, germinação e conversão, as culturas foram mantidas sob 30 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de radiação luminosa.

4.3.2 Ensaio 1

Tendo em vista o conhecimento prévio sobre a resposta ao processo de embriogênese somática de 'Williams 82', o presente experimento teve como objetivo monitorar esse processo *in vitro*, assim como observar o comportamento do genótipo PI 123439 nas mesmas condições descritas como favoráveis para obtenção de embriões somáticos.

Embriões zigóticos imaturos foram inoculados em meio de indução: MSB suplementado com 40,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D, 3% de sacarose, 0,2% de Phytigel e pH ajustado para 7,0.

Após 10 dias no meio de indução, os explantes foram transferidos para meio de histodiferenciação que consistiu de MSB contendo 0,5% de carvão-ativado, 6% de maltose, 0,2% de Phytigel e pH ajustado para 5,8. Avaliou-se a

resposta embriogênica após 45 dias, sendo contados o número de explantes embriogênicos e de embriões por explante.

Os embriões formados foram individualizados e transferidos para meio de maturação: MSB, 6% de maltose, 0,2% de Phytigel e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Ao apresentarem coloração amarelada, característica descrita por Parrott (1998) como de maturidade fisiológica, os embriões passaram por um processo de dessecação em placas de Petri, desprovidas de meio de cultura e seladas com Parafilm, por um período de dois dias. Após esse procedimento, os embriões foram transferidos para meio de germinação que consistiu de MSB, 3% de sacarose, 0,2% de Phytigel e pH ajustado para 5,8.

O ensaio foi conduzido em quatro etapas, ou seja, a cada 30 a 45 dias foram inoculadas quatro placas contendo 10 explantes, totalizando-se 16 placas e 160 explantes.

As plântulas obtidas a partir do meio de germinação foram aclimatadas progressivamente em copos plásticos com capacidade de 700 mL contendo substrato (vermiculita) autoclavado mantidos em sala de crescimento sob temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e 16 horas de fotoperíodo. Em seguida, as plantas foram levadas em condições de campo.

4.3.3 Ensaio 2

Tendo em vista que o genótipo PI 123439 não respondeu ao protocolo descrito em 4.3.2, mas mostrou-se responsivo a tratamentos com baixo nível de 2,4-D, o objetivo deste ensaio foi verificar se os explantes cotiledonares desse genótipo formariam embriões somáticos utilizando somente $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D. Após 10 dias em meio de indução, os explantes foram transferidos para o meio de histodiferenciação, como descrito em 4.3.2.

4.4 Estudos anatômicos da embriogênese somática

Explantos cotiledonares do genótipo PI 123439 e 'Williams 82', providos de embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento, bem como embriões somáticos isolados, foram coletados durante o período de indução *in vitro* nas condições descritas nos itens 4.2.2, 4.2.3. e 4.3.2. Essas amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) e levadas a uma bomba à vácuo para retirada do ar contido nos espaços intercelulares. Após a fixação, as amostras foram desidratadas em série alcoólica-etílica e infiltradas com a resina glicol metacrilato da Reichert-Jung. As secções foram cortadas em micrótomo rotativo manual (Leica) com navalha do tipo C a 5 µm de espessura, posteriormente coradas com azul de toluidina 0,05% em tampão fosfato e ácido cítrico (Sakai, 1973) e montadas em resina sintética "Entellan" (Merck).

As lâminas foram fotomicrografadas em microscópio NIKON AFX - DX, com a escala micrométrica fotografada e ampliada nas mesmas condições ópticas utilizadas.

4.5 Análises ultra-estruturais

Embriões somáticos do genótipo PI 123439 e 'Williams 82' foram analisados ao microscópio eletrônico de varredura. As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) e levadas a uma bomba de vácuo. Posteriormente, procedeu-se a desidratação das amostras em série alcoólica-etílica até álcool absoluto e, em seguida, passagem pelo ponto crítico de CO₂ (Horridge & Tamm, 1969), montagem sobre suportes de alumínio e recobrimento com uma camada de ouro de 30 a 40 nm. As análises e as eletromicrografias foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura modelo DSM 940A Zeiss, operado a 5 kV, com as escalas das eletromicrografias diretamente impressas nas mesmas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Procedimentos de cultura de tecidos

5.1.1 Primeira fase do projeto

5.1.1.1 Ensaio 1

A massa da matéria fresca inicial dos explantes cotiledonares foi em média de 3 mg. O genótipo BR 8014853 mostrou maior proliferação celular (calo) em relação ao genótipo PI 123439 sendo que, no 28º dia de cultura, observou-se um aumento na massa da matéria fresca dos calos (Figura 1). Embora o genótipo BR 8014853 tenha apresentado, em média, maior massa de matéria fresca dos calos, os explantes não apresentaram qualquer resposta morfogênética.

Por outro lado, para o genótipo PI 123439 foram observadas protuberâncias (Figura 5A, seta menor) sobre a superfície dos explantes cuja análise histológica (item 5.2) confirmou sua natureza embriogênica. Observou-se que nas três concentrações de auxina, o número de protuberâncias aumentou no decorrer do tempo de cultura (Figura 2). Verificou-se também que na concentração de $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D a média de protuberâncias por explante cotiledonar foi de 2,79, portanto superior em relação às concentrações de $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ e $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ que apresentaram médias iguais a 1,91 e 1,79, respectivamente (Figura 3).

Para *Glycine max*, o processo de regeneração via embriogênese somática é descrito, em sua maioria, como um processo direto sem intervenção de uma fase de calo (Hartweck et al., 1988; Liu et al., 1992; Yuqing et al., 1995). De fato, embora o genótipo PI 123439 tenha formado calo na região de seccionamento do explante, as protuberâncias caracterizadas como embriogênicas nunca ocorreram na região do calo sendo sempre formadas ao longo da superfície dos explantes cotiledonares (Figura 5A, setas). Provavelmente, a falta de resposta embriogênica do genótipo BR 8014853 deveu-se à completa alteração da estrutura do explante em decorrência da maior proliferação celular nas condições de cultura analisadas.

5.1.1.2 Ensaio 2

Nos genótipos avaliados (PI 123439 e BR 8014853) o uso de 10,0 mg.L⁻¹ de NAA sob diferentes concentrações de sacarose (0,1%, 0,5% e 2,5%) não se mostrou eficiente para o processo de embriogênese somática *in vitro*. Observou-se apenas uma pequena proliferação celular de coloração esbranquiçada sem qualquer formação de estruturas semelhantes a embriões somáticos. Entretanto, Lazzeri et al. (1988), utilizando o NAA como fonte de auxina, relataram a formação de calo limitada às regiões de seccionamento do tecido do explante porém, os embriões somáticos observados em cultura formaram-se diretamente do explante.

As observações feitas no presente ensaio contrariam os dados obtidos por Komatsuda et al. (1992) que verificaram a formação de embriões somáticos morfológicamente normais para os cultivares de soja 'American Yellow' e 'Viking' utilizando 10,0 mg.L⁻¹ de NAA e 0,5% de sacarose. Anteriormente, Komatsuda & Ohyama (1988) já haviam observado a formação de embriões somáticos em meio suplementado com 10,0 mg.L⁻¹ de NAA, utilizando 3% de sacarose.

Contudo, as respostas obtidas utilizando-se a combinação NAA e sacarose não foram sempre eficientes quanto ao processo de indução da embriogênese somática para *G. max*. Calvo (1989) verificou que explantes cotiledonares de 'IAS-5' em meio suplementado com diferentes concentrações de NAA (5,0; 10,0; 15,0; 20,0 e 25,0 mg.L⁻¹) e contendo 3% de sacarose apresentaram-se brancos, sem qualquer sinal de crescimento, embriogênese ou formação de calo. Santarém (1992) relatou que a adição de NAA (2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 mg.L⁻¹) ao meio contendo 3 ou 6% de sacarose induziu a formação de raízes em 'IAS-5' e 'Ivorá', em ambas concentrações de sacarose.

Possivelmente, os resultados obtidos neste segundo ensaio estão relacionados aos genótipos utilizados bem como ao estado fisiológico dos explantes, como discutido por Calvo (1989).

5.1.1.3 Ensaio 3

Ao avaliar a resposta embriogênica dos genótipos PI 123439 e BR 8014853 à auxina 2,4,5-T nas mesmas concentrações de sacarose utilizadas no ensaio anterior (5.1.1.2), novamente a resposta não foi satisfatória. Os explantes cotiledonares apresentaram-se amarelos após quatro dias, permanecendo assim até 30 dias, quando foi feita a avaliação. Contrariamente, Calvo (1989) observou a formação de embriões somáticos morfologicamente normais nas mesmas condições de cultura. Suhasini et al. (1996) também observaram a formação de embriões somáticos de *Cicer arietinum*, utilizando 3,0 mg.L⁻¹ de 2,4,5-T; entretanto esses embriões eram morfologicamente anormais.

5.1.1.4 Ensaios 4 e 5

Os explantes cotiledonares dos genótipos PI 123439 e BR 8014853 não responderam satisfatoriamente aos tratamentos com altas concentrações de

2,4-D, contrariando os dados obtidos na literatura (Liu et al., 1992; Bailey et al., 1993; Li & Grabau, 1996; Santarem et al., 1997; Parrott, 1998).

Bodanese-Zanettini et al. (1993) sugeriram que para incrementar a resposta à indução e à produção de plântulas seria necessário aumentar a concentração de 2,4-D no estágio de indução. Porém, para os genótipos avaliados nos ensaios 4 e 5, os explantes cotiledonares apresentaram-se amarelos após 7 dias em meio de cultura, não formando qualquer estrutura embriogênica.

Em ambos os experimentos as respostas obtidas foram iguais, independente do tipo de recipiente utilizado (frasco ou placa de Petri).

5.1.1.5 Ensaio 6

Após 30 dias em meio de cultura, os explantes cotiledonares dos genótipos PI 123439, PI 165896, PI 239235 e BR 808858 foram avaliados quanto ao número de estruturas embriogênicas.

Observou-se que apesar da formação de calo, as análises histológicas (item 5.2) demonstraram não haver influência da massa de calo em relação à formação de estruturas embriogênicas, já que a embriogênese somática em *G. max* ocorria diretamente, como observado por Lazzeri et al. (1988) que relataram a formação de embriões somáticos diretamente do explante, apesar de haver formação de calo em meio suplementado com NAA.

Para os genótipos PI 165896, PI 239235 e BR 808858 mantidos em meio suplementado com 0,8 mg.L⁻¹ de 2,4-D não houve formação de qualquer estrutura semelhante a embrião somático. Entretanto, observou-se a formação de cerca de 10% de embriões somáticos, isto é, quatro em um total de 42 explantes cotiledonares excisados de PI 123439. Nas altas concentrações da auxina (20,0 e 40,0 mg.L⁻¹) não foram verificadas estruturas embriogênicas para nenhum dos genótipos. Entretanto, protocolos atuais (Li & Grabau, 1996;

Santarem et al., 1997; Parrott, 1998) utilizam altos níveis de 2,4-D para a indução do processo embriogênico

5.1.2 Segunda fase do projeto

5.1.2.1 Ensaio 1

Num ensaio preliminar, explantes cotiledonares de 'Williams 82' mantidos sob condições de indução propostas por Parrott (1998), adquiriram coloração amarela e cerca de duas semanas não se observou a formação de qualquer estrutura embriogênica. Entretanto, Parrott (1998) verificou a formação de embriões somáticos sobre os explantes cotiledonares no estágio globular cerca de duas semanas em meio de indução. Sabendo-se que algumas espécies de leguminosas como *G. max* requerem ausência de auxina para que ocorra o processo de histodiferenciação (Parrott, 1995), explantes cotiledonares de 'Williams 82' foram transferidos do meio de indução para meio de histodiferenciação onde, após 8 dias, observou-se a formação de embriões somáticos.

A cultura foi avaliada após 45 dias em meio de histodiferenciação como descrito no item 4.3.2. A Tabela 1 indica o número médio de embriões somáticos obtidos por ensaio.

Tabela 1 - Número (Nº) médio de embriões somáticos obtidos por explante em 'Williams 82'.

Ensaio	Nº médio de embriões por explante	Nº total de embriões	Amplitude do número de embriões
1	3,05 ± 3,37*	122	0 a 12
2	1,60 ± 1,76	64	0 a 6
3	4,30 ± 3,71	172	0 a 12
4	2,47 ± 2,85	99	0 a 8

* Em seguida às médias, estão os respectivos desvios padrões.

Desconsiderando-se os quatro ensaios do ponto de vista temporal e, uma vez que as condições de cultura são idênticas, o número médio de embriões por explante foi igual a $2,85 \pm 3,14$ sendo que o número total de embriões somáticos foi igual a 457.

No presente estudo, também foi possível caracterizar alguns tipos morfológicos com base na forma e número de cotilédones. A Figura 17 apresenta alguns dos embriões somáticos mais característicos na cultura.

O tipo morfológico mais freqüente da cultura caracterizou-se por apresentar um hipocótilo bem definido e cotilédones assemelhando-se a um cone sendo denominado corneta (Figuras 17 e 18A). Esses embriões somáticos germinaram, porém não foram capazes de se converter em plântulas (Figura 18C). Entretanto, produziram maior número de raízes que os embriões somáticos capacitados para conversão. Suhasini et al. (1996) relataram fato similar em *Cicer arietinum*, assim como Buchheim et al. (1989) que também

observaram um sistema radicular mais intenso nos embriões somáticos de *G. max* que não foram capazes de se converter em plântulas.

Embriões somáticos apresentando cotilédones múltiplos (Figura 17B e 20A), quando em meio de histodiferenciação (Figura 17B), passavam a apresentar hipocótilo fasciado (Figura 20A, seta), não sendo capazes de se converter em plântulas (Figura 20C). Portanto, a conversão (Figura 19A) somente ocorreu quando esses embriões somáticos multicotiledonares eram colocados para germinar numa fase de desenvolvimento similar à mostrada na Figura 20A (asterisco).

Embriões somáticos exibindo hipocótilo definido e um dos cotilédones mais desenvolvido que outro (Figuras 17D, 21A e B) foram classificados como anisocotiledonares. Embriões somáticos apresentando somente um cotilédone foram classificados como monocotiledonares (Figura 22A e B). Ocasionalmente, ambos os tipos foram capazes de se converter em plântulas (Figuras 21C e 22C). A Tabela 2 e a Figura 4 sumarizam os dados obtidos nos quatro ensaios quanto aos tipos morfológicos.

Tabela 2. Tipos morfológicos dos embriões somáticos obtidos a partir de explantes cotiledonares de 'Williams 82'.

Ensaio	Cometa	Monoc.	Multic.	Anisoc.	Normal	Fasciado	Outros
1 (122)	47 (38,52%)	11 (9,01%)	8 (6,55%)	6 (4,91%)	4 (3,27%)	4 (3,27%)	16 (13,11%)
2 (64)	20 (31,25%)	20 (31,25%)	1 (1,56%)	3 (4,68%)	4 (6,25%)	1 (1,56%)	6 (9,37%)
3 (172)	67 (38,95%)	35 (20,34%)	17 (9,88%)	3 (1,74%)	3 (1,74%)	0 (0,00%)	41 (23,83%)
4 (99)	34 (34,34%)	14 (14,14%)	3 (3,03%)	2 (2,02%)	6 (6,06%)	3 (3,03%)	26 (26,26%)
Total: 457	168 (36,76%)	80 (17,50%)	29 (6,34%)	14 (3,06)	17 (3,71%)	8 (1,75%)	89 (19,47%)
Média	42,00 ± 19,98*	20,00 ± 10,67	7,25 ± 7,13	3,50 ± 1,73	4,25 ± 1,25	2,00 ± 1,82	22,25 ± 14,93

* Em seguida às médias, estão os respectivos desvios padrões.

As diferenças quanto à soma dos dados deve-se às perdas por contaminação do material em cultura.

Monoc. - monocotiledonar; Multic. - multicotiledonar; Anisoc. - anisocotiledonar.

As variações morfológicas encontradas no presente trabalho podem ter sido ocasionadas pelo efeito da auxina. Lazzeri et al. (1987b) constataram que embriões somáticos induzidos com NAA exibiram bipolaridade, com regiões radicular e hipocotiledonar distintas, enquanto a indução por 2,4-D originou embriões com cotilédones fusionados e ápice caulinar não desenvolvido. Similarmente, Buccheim et al. (1989) também observaram diferentes tipos morfológicos de embriões somáticos induzidos por 2,4-D indicando que a fonte de auxina exerce influência sobre o aspecto morfológico dos embriões somáticos. Segundo Parrott (1995), a metilação do DNA pode ocorrer na presença desse regulador vegetal alterando programas de expressão gênica.

Após avaliação, os embriões somáticos foram transferidos para meio de maturação no qual passaram a exibir coloração amarela. Cerca de 15 dias nessas condições de cultura os embriões foram submetidos a um período de dessecação. Em seguida os embriões somáticos foram transferidos para meio de germinação onde alguns desses foram capazes de se converter em plântulas, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3. Porcentagem de conversão dos embriões somáticos de 'Williams 82'.

Número de ensaios	Corneta	Monoc.	Multic.	Anisoc.	Normal	Fasciado	Outros
4	0 (0,00%)*	6 (7,50%)	4 (13,79%)	1 (7,14%)	2 (11,75%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)
Total de embriões: 457	168	80	29	14	17	8	89

* Número de plantas formadas seguidas das respectivas porcentagens de conversão para os quatro ensaios.

Monoc. - monocotiledonar; Multic. - multicotiledonar; Anisoc. - anisocotiledonar.

Importante destacar que a diversidade morfológica encontrada nos embriões somáticos do presente ensaio, possivelmente, afetou a eficiência de conversão desses embriões em plântulas, como observado por Rodriguez & Wetzstein (1998) em embriões somáticos de *Carya illinoensis* que não apresentaram ápice caulinar definido. As autoras evidenciaram que tecidos induzidos em meio suplementado com 2,4-D têm regiões de divisão celular mais intensa e heterogêneas que podem interferir nos padrões normais de desenvolvimento de embriões somáticos.

Os resultados obtidos revelaram uma diferença marcante entre o controle 'Williams 82' e o genótipo PI 123439 para o mesmo protocolo (Figuras 12A e B). Enquanto 'Williams 82' apresentava um grande número de embriões somáticos ao longo da lâmina cotiledonar (Figura 12B), os explantes do genótipo PI 123439 formavam apenas calo e algumas raízes (Figura 12A). Tian et al. (1994) observaram que a produção de embriões somáticos foi dependente do genótipo obtendo respostas que variaram entre 18 e 98%. Similarmente, Li & Grabau (1996) indicaram uma dependência genotípica quanto ao rendimento de embriões somáticos. Os autores obtiveram 89% e 26% dos explantes cotiledonares de 'Bay' e 'Peking', respectivamente, respondendo ao processo de indução da embriogênese somática *in vitro*.

Segundo Santos et al. (1997), não existiu relação entre a capacidade de produção de embriões e a frequência de conversão. Os autores relataram que 'IAS-5' formaram menor número de embriões somáticos, porém apresentaram maior capacidade de conversão. Por outro lado, Bailey et al. (1993) observaram que o genótipo PI 417138 foi menos responsivo ao processo de indução, entretanto demonstrou maior capacidade de germinação e conversão em plântulas. No presente trabalho, 'Williams 82' apresentou uma alta capacidade embriogênica tendo 73,12% dos explantes formando embriões somáticos, ou seja, considerando os quatro ensaios obteve-se 117 explantes embriogênicos em um total de 160 explantes. Entretanto, do número inicial de

embriões somáticos obtidos (457), apenas 2,84% foram capazes de se converter em plântulas. Essas plântulas foram aclimatadas progressivamente e levadas à campo tornado-se reprodutivas (Figuras 23A-D).

5.1.2.2 Ensaio 2

Os explantes cotiledonares do genótipo PI 123439 após 10 dias em meio de indução contendo $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D foram transferidos para meio de histodiferenciação porém, não houve a formação de qualquer estrutura embriogênica. Esse resultado confirma a influência genotípica na resposta embriogênica em soja.

5.2 Estudo anatômico e ultra-estrutural da embriogênese somática

O cultivo de cotilédones imaturos de embriões zigóticos do genótipo PI 123439 em meio de cultura suplementado com baixa concentração de 2,4-D ($0,8 \text{ mg.L}^{-1}$), como descrito no ensaio 4.2.2, promoveu a formação de estruturas globulares sobre a superfície desses explantes a partir do 8º dia em cultura (Figuras 5A, seta menor e 7A).

A análise das Figuras 5B e 5C permitiu verificar que as estruturas globulares resultavam de divisões localizadas no mesofilo cotiledonar, sendo que a epiderme revestia a protuberância. Em geral, entre as células meristemáticas da protuberância diferenciavam-se elementos traqueais (Figuras 5B e C, 7B e D, setas). Num estágio posterior de desenvolvimento, essas estruturas alongavam-se (Figuras 5A, seta maior, 6A e 7E), podendo dar origem a embriões somáticos (Figura 7C) ou a raízes (Figuras 6B, seta e 7F).

As estruturas globulares que originaram embriões somáticos com bipolaridade bem definida foram observadas nas extremidades do explante (Figura 7A e B). Por outro lado, as estruturas que deram origem a raízes foram

observadas ao longo de toda superfície do explante (Figuras 6A e 7E). Portanto, em ambos os processos morfogenéticos a via era direta sem a formação de calo.

Hartweck et al. (1988) relataram que explantes cotiledonares imaturos de *G. max* ('McCall' e 'J103') cultivados em níveis de 2,4-D menores que 1,0 mg.L⁻¹ mostraram as regiões submarginais (similares à mostrada na Figura 7B) como os principais sítios embriogênicos quando esses explantes estavam com a superfície abaxial em contato com o meio de cultura. Além disso, observaram que protrusões formadas sobre a superfície dos explantes eram sempre associadas ao tecido vascular e podiam originar raízes e protuberâncias neomórficas. Os autores indicaram essas características como áreas meristemáticas não embriogênicas. Entretanto, no presente estudo, observou-se que o mesmo tipo morfo-anatômico de protrusão podia desenvolver-se em embriões somáticos (Figura 8A-E) ou em raízes (Figura 7F). Porém, apenas as protrusões das regiões submarginais formaram embriões somáticos, concordando com as observações de Hartweck et al. (1988).

Handro et al. (1973) relataram que a formação de raízes em *Petunia inflata* em meio de cultura suplementado com baixa concentração de 2,4-D (2,0 mg.L⁻¹) foi precedida pelo desenvolvimento de um meristema periférico, que apresentava citoplasma denso e núcleo proeminente similar ao observado no presente estudo nas Figuras 5C e 7B. Tais características de células meristemáticas foram observadas por Fernando (1996) em *Carica papaya* também utilizando a concentração de 2,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D em meio de cultura, entretanto, essas células originaram embriões somáticos. Possivelmente, no presente estudo, a variação na formação de estruturas morfogenéticas esteja relacionada ao acúmulo polar de um hormônio endógeno o qual pode ter favorecido a formação de embriões somáticos do genótipo PI 123439 na extremidade do explante como também observado por Choi & Soh (1996) em *Panax ginseng*, enquanto que a formação de raízes ao longo da superfície do explante cotiledonar ocorreu devido a um baixo nível hormonal nessa região.

As estruturas globulares que seguiram o processo embriogênico evoluíram para embriões somáticos mal formados com estruturas cotiledonares múltiplas (Figuras 8A e E, 10A-F). Entretanto, foi possível visualizar a presença de um meristema apical radicular e áreas meristemáticas associadas a cada estrutura cotiledonar (Figuras 8E e 10B, pontas de setas), como observado por Passos et al. (1999) em embriões somáticos de *Vitis* spp.

A diferenciação vascular precoce no eixo embrionário e o acúmulo de produtos de reserva, principalmente amido (Figura 9), comuns no processo embriogênico do genótipo PI 123439, vêm sendo associados ao processo de germinação precoce (Passos et al., 1999). Esse fato deve-se à uma expressão contínua e simultânea de um programa de desenvolvimento embriônico (Galau et al., 1991) que pode ser caracterizado pelo acúmulo de produtos de reserva, como também observado por Faure et al. (1996) em embriões somáticos de *Vitis*.

Segundo Ammirato (1987), a embriogênese em células cultivadas *in vitro* é altamente repetitiva e embriões somáticos podem formar embriões menores ao longo do seu eixo e, algumas vezes, restritos a certos locais tais como a junção hipocótilo-radícula, como observado para o genótipo PI 123439, cujos embriões secundários formavam-se entre a porção hipocotiledonar e radicular do embrião somático primário (Figura 8B-D). Fato similar foi descrito por Passos et al. (1999) em *Vitis* spp. As análises ultra-estruturais e anatômicas desses embriões somáticos secundários (Figuras 8C e D e 10F) mostraram a presença de um meristema apical caulinar (Figura 8C, seta) e independência vascular desse embrião (Figuras 8D e 10F, setas).

Segundo Maheswaran & Williams (1985), a embriogênese secundária em *Trifolium repens* relacionou-se com a repressão do desenvolvimento normal dos embriões somáticos primários. Suhasini et al. (1996) sugeriram um processo de desdiferenciação de certas células, as quais originaram embriões somáticos secundários em estágio globular de desenvolvimento.

Quando os explantes cotiledonares do genótipo PI 123439 foram inoculados em meio de cultura contendo $40,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D, observou-se, após 42 dias, a coloração amarelada do explante e a formação de uma massa de calo friável de aspecto gelatinoso (Figura 11A). A análise anatômica desses explantes revelou uma proliferação celular desorganizada e uma vacuolização acentuada das células do mesofilo cotiledonar. Algumas células apresentaram-se plasmolisadas e outras colapsadas. A camada epidérmica era descontínua (Figura 11B). Assim sendo, essa proliferação celular não apresentava padrões celulares normalmente relacionados com o processo embriogênico *in vitro* (Williams & Maheswaran, 1986).

Os explantes cotiledonares do genótipo PI 123439, que foram submetidos ao meio de indução MSB suplementado com $40,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D por 10 dias e que, após esse período foram transferidos para meio de cultura livre de auxina contendo 0,5% de carvão ativado, formaram apenas raízes (Figura 12A), contrastando com os explantes cotiledonares do cultivar utilizado como controle ('Williams 82') (Figura 12B), cujo processo embriogênico será descrito a seguir.

Pelo exposto, o genótipo PI 123439, embora apresente potencial para a embriogênese somática em baixas concentrações da auxina 2,4-D, ainda requer estudos posteriores para o estabelecimento de um protocolo eficiente. Segundo Bailey et al. (1993), genótipos semi-selvagens compatíveis sexualmente com culturas melhoradas podem ser uma fonte de introgressão de genes em linhagens elite com baixo rendimento para produção de embriões somáticos.

Os embriões somáticos de 'Williams 82' foram observados após 8 dias em meio MSB contendo 0,5% de carvão ativado, conforme descrito no item 4.3.2. O processo de embriogênese somática *in vitro* ocorreu diretamente a partir do explante cotiledonar, sem a intervenção de uma fase de calo, assim como relatado anteriormente para PI 123439. Similarmente, Yuqing et al. (1995) observaram a formação de estruturas embriogênicas de diferentes

genótipos de *G. max* diretamente do explante cotiledonar. Maheswaran & Williams (1985) também verificaram que células epidérmicas do hipocótilo produziram embriões somáticos de *Trifolium repens*, sem uma fase de calo.

As estruturas globulares formadas apresentaram, semelhantemente àquelas descritas para PI 123439, epiderme contínua com o tecido do explante (Figuras 13A-C) e originaram-se a partir de divisões celulares nas camadas subepidérmicas do mesofilo cotiledonar, caracterizando uma origem multicelular (Figura 14C, em detalhe) para os embriões somáticos. Porém, estes embriões pré-globulares nunca apresentaram diferenciação vascular precoce como descrito anteriormente para o genótipo PI 123439.

No presente estudo não foi observada a origem unicelular dos embriões somáticos para ambos os genótipos analisados e nenhum dos embriões apresentou estrutura semelhante a um suspensor (Figuras 13F e 14A-C). Por outro lado, Fernando (1996) descreveu que na origem unicelular os embriões somáticos de *Carica papaya*, originados a partir de células epidérmicas do explante cotiledonar, apresentaram uma estrutura semelhante a um suspensor. Segundo Williams & Maheswaram (1986) e Dornelas et al. (1992), os embriões somáticos de origem multicelular tendem a apresentar a base do eixo embrionário amplamente ligado ao explante sem a formação do suspensor ou estrutura equivalente conforme verificado no presente estudo. Segundo os mesmos autores, estes embriões somáticos às vezes podem aparecer ligados ao explante pelo eixo embrionário como pode ser verificado na Figura 14B no presente estudo.

Hartweck et al. (1988) relataram que embriões somáticos de *G. max* induzidos em $10,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de NAA tiveram origem unicelular ou multicelular, porém embriões induzidos em meio de cultura suplementado com $25,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D eram sempre de origem multicelular, confirmando as observações realizadas no presente estudo.

Os embriões somáticos de 'Williams 82' formaram-se ao longo da superfície do explante cotiledonar imaturo (Figuras 12B e 15C). Segundo

Hartweck et al. (1988), parece existir uma relação entre a posição do explante e o nível de auxina ministrado ao meio de cultura. De acordo com os autores, os explantes com a superfície abaxial em contato com o meio de cultura provido de altas concentrações de 2,4-D foram estimulados a formar embriões somáticos na região central da lâmina cotiledonar, como observado no presente estudo para 'Williams 82'. Por outro lado, os autores verificaram que explantes posicionados com a superfície abaxial em contato com meio de cultura provido de baixas concentrações de 2,4-D apresentaram embriões somáticos nas extremidades do explante, como verificado no processo de indução da embriogênese somática para os explantes do genótipo PI 123439 em meio de cultura suplementado com $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D conforme descrito anteriormente.

Para 'Williams 82' os embriões somáticos pré-globulares formaram-se independentemente (Figuras 13A e B) ou muito próximos (Figura 13C, seta). Os embriões pré-globulares isolados evoluíram para estágios posteriores do desenvolvimento embriológico, formando embriões somáticos globulares (Figuras 15A e 15C, seta menor), cordiformes (Figuras 13D e E) e torpedos (Figuras 13F, 14A, 15B e 15C, seta maior) independentes em relação ao tecido do explante e exibindo sistema vascular próprio. Por outro lado, os embriões somáticos pré-globulares que formaram-se muito próximos (Figura 13C seta), numa fase posterior do desenvolvimento apareciam unidos pela região basal (Figura 14C).

Importante destacar que o processo de embriogênese somática apresentou-se de maneira assincrônica (Figuras 12B, 14C e 15C). Embriões somáticos globulares puderam ser observados juntamente com estágios embriológicos mais avançados de desenvolvimento (Figura 15C, setas), como relatado por Dornelas et al. (1992), Rodriguez & Wetsztein (1994) e Passos et al. (1999) em *Stylosanthes scabra*, *Carya illinoensis* e *Vitis*, respectivamente.

No presente estudo, o tipo morfológico mais comumente encontrado apresentou os cotilédones em formato de cone (Figuras 16, 17A e 18A),

segundo a descrição de Hartweck et al. (1988). Estes embriões apresentavam meristema apical radicular, porém, ausência de meristema apical caulinar (Figura 18B), confirmando as observações de Hartweck et al. (1988) que caracterizaram esses embriões somáticos como cornetas. Este tipo morfológico, embora germinasse, nunca foi capaz de se converter em plântula (Figura 18C).

Os embriões somáticos caracterizados como multicotiledonares em estágio inicial de desenvolvimento (Figuras 17B e 20A, asteriscos), apresentavam meristema apical caulinar e eixo hipocotiledonar não fasciado (Figura 19B, seta). Estes embriões no decorrer da cultura passaram a exibir eixo hipocotiledonar fasciado (Figura 20A, seta), como observado por Chengalrayan et al. (1997) em embriões somáticos de *Arachis hypogaea*. A análise anatômica desses embriões revelou uma vascularização irregular ao longo do eixo hipocotiledonar e a ausência de meristema caulinar entre as estruturas cotiledonares (Figura 20B). Também Passos et al. (1999) verificaram que embriões somáticos de *Vitis* eram idênticos aos correspondentes zigóticos até o estágio torpedo. Segundo as autoras, após este estágio, os embriões mostravam um comportamento teratológico no qual o ápice caulinar sempre presente nos embriões torpedos não eram mais reconhecíveis nos embriões gigantes ou T⁺, pois este se diferenciava e perdia suas características meristemáticas assim que a embriogênese avançava. O mesmo parece estar ocorrendo nesta classe de embriões somáticos (Figura 17B) e poderia explicar o porquê de alguns embriões somáticos desta classe converterem em plântulas e, posteriormente em plantas (Figuras 19A, 23A-D) e outros não (Figura 20C).

Verificou-se que em uma das amostras do embrião somático multicotiledonar fasciado houve a formação de uma plântula localizada lateralmente em relação ao eixo embrionário (Figura 20C), possivelmente, originada a partir de um embrião somático secundário.

Embriões somáticos classificados como anisocotiledonares apresentaram um cotilédone bastante desenvolvido e outro rudimentar (Figuras

17D e 21A e B). Observou-se também embriões com apenas um cotilédone caracterizado como monocotiledonar (Figuras 17C e 22A e B). Estes dois padrões morfológicos foram capazes de se desenvolver em plântulas (Figuras 21C e 22C).

As más-formações observadas durante a embriogênese somática *in vitro* possivelmente podem estar relacionadas ao emprego de auxinas no meio de cultura. Liu et al. (1993) propuseram que o sítio de síntese de auxina seria o primórdio caulinar e que o transporte dessa substância em direções opostas no embrião globular iniciariam a formação dos cotilédones. Entretanto, a inibição desse transporte acarretaria num acúmulo de auxina formando cotilédones com aspecto de colar. Rodriguez & Wetzstein (1998) sugeriram que altos níveis de auxina exógena no meio de cultura ou presentes no tecido poderiam modificar a síntese e a distribuição dos níveis de auxina no interior do embrião.

O fato dos embriões somáticos anormais de *G. max* apresentarem meristema apical radicular desenvolvido e, ocasionalmente um meristema apical caulinar, pode estar relacionado com um processo de germinação precoce caracterizado pelo desenvolvimento antecipado do meristema apical radicular e interrupção na atividade meristemática do ápice caulinar, como descrito por Passos et al. (1999).

A presença de um meristema apical radicular permitiu que todos os embriões somáticos germinassem assim como relatado por Suhasini et al. (1996). Entretanto, o processo de conversão somente foi possível naqueles embriões que apresentaram meristema apical caulinar bem definido.

6 CONCLUSÕES

Primeira fase do projeto

- ✓ Dos genótipos testados, apenas PI 123439 mostra-se responsivo ao processo embriogênico quando explantes cotiledonares são inoculados em meio MSB suplementado com $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D.
- ✓ Os embriões somáticos do genótipo PI 123439 apresentam cotilédones múltiplos e formação de um meristema apical radicular e áreas meristemáticas associadas a cada estrutura cotiledonar. Verifica-se a ocorrência de embriões somáticos secundários entre a porção hipocotiledonar e radicular dos embriões somáticos primários.
- ✓ Estudos posteriores são necessários para o estabelecimento de um protocolo eficiente para o genótipo PI 123439.

Segunda fase do projeto

- ✓ No protocolo proposto por Parrott (1998), 'Williams 82' produz uma média de 2,85 embriões somáticos por explante. Entretanto, o genótipo PI 123439 forma apenas calo e algumas raízes.
- ✓ Os explantes cotiledonares do genótipo PI 123439 induzidos nas mesmas condições de cultura propostas por Parrott (1998) e transferidos, após 10 dias, para meio livre de auxina, formam apenas raízes.
- ✓ Para ambos os genótipos avaliados a origem dos embriões somáticos é multicelular e direta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMMIRATO, P.V. Organizational events during somatic embryogenesis. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 3., New York, 1987. **Plant biology**. New York: Alan R. Liss, 1987. p.57-81.
- BAILEY, M.A.; BOERMA, H.R.; PARROTT, W.A. Genotype effects on proliferative embryogenesis and plant regeneration of soybean. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v.29, n.3, p.102-108, July 1993.
- BARWALE, U.B.; WIDHOLM, J.M. Soybean: plant regeneration and somaclonal variation. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Biotechnology in agriculture and forestry 10 - Legumes and Oilseed Crops I**. Berlin: Springer-Verlag, 1990. cap. II.2, p.114-133.
- BODANESE-ZANETTINI, M.A.; ORTOLAN, M.G.S.; HU, C. Y. Somatic embryoid induction from brazilian soybean cultivars. **Brazilian Journal of Genetics**, v.16, n.1, p.129-134, Mar. 1993.
- BOND, J.E.; GRESSHOFF, P.M. Soybean transformation to study molecular physiology. In: GRESSHOFF, P.M. (Ed.) **Plant responses to the environment**. Boca Raton: CRC Press, 1993. cap. 3, p.25-44.

- BUCHHEIM, J.A.; COLBURN, S.M.; RANCH, J.P. Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth. **Plant Physiology**, v.89, n.3, p.768-775, Mar. 1989.
- CALVO, E.S. Embriogênese somática em soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Piracicaba, 1989. 146p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- CHENGALRAYAN, K.; MHASKE, V.B.; HAZRA, S. Genotypic control of peanut somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v.17, n.6/7, p.522-525, Apr. 1998.
- CHENGALRAYAN, K.; MHASKE, V.B.; HAZRA, S. High-frequency conversion of abnormal peanut somatic embryos. **Plant Cell Reports**, v.16, n.11, p. 783-786, Sept. 1997.
- CHOI, Y.E.; SOH, W.Y. Effect of plumule and radicle on somatic embryogenesis in the cultures of ginseng zygotic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.45, p.137-143, 1996.
- CHRISTOU, P.; YANG, N.S. Developmental aspects of soybean (*Glycine max*) somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, v.64, n.2, p.225-234, Aug. 1989.
- DAHMER, M.L.; COLLINS, G.B.; HILDEBRAND, D.F. Lipid content and composition of soybean somatic embryos. **Crop Science**, v.31, n.2, p.741-746, May/June 1991.

- DETREZ, C.; NDIAYE, S.; DREYFUS, B. *In vitro* regeneration of the tropical multipurpose leguminous tree *Sesbania grandiflora* from cotyledon explants. **Pant Cell Reports**, v.14, n. 2/3, p.87-93, Dec. 1994.
- DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Histological analysis of organogenesis and somatic embryogenesis induced in immature tissues of *Stylosanthes scabra*. **Annals of Botany**, v.70, n.5, p.477-482, Nov. 1992.
- FAURE, O.; AARROUF, J.; NOUGARÈDE, A. Ontogenesis, differentiation and precocious germination in anther-derived somatic embryos of grapevine (*Vitis vinifera* L.): proembryogenesis. **Annals of Botany**, v.78, n.1, p.23-28, July 1996.
- FERNANDO, J.A. Análise anatômica da calogênese e da embriogênese somática *in vitro* de *Carica papaya* L. Rio Claro, 1996. 32p. Monografia (Graduação) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".
- FERREIRA, A.G.; YEH-HU, C.; SANTARÉM, E.R. Somatic embryogenesis of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill), brazilian cultivars Ivorá and IAS-5. **Phyton**, v.51, n.2, p.139-144, 1990.
- GALAU, A.G.; JAKOBSEN, K.S.; HUGHES, D.W. The controls of late dicot embryogenesis and early germination. **Physiologia Plantarum**, v.80, n.2, p.280-288, Feb. 1991.

- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v.50, p.151-158, 1968.
- GASPAR, T.; KEVERS, C.; PENEL, C.; GREPPIN, H.; REID, D.M.; THORPE, T.A. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. In **Vitro Cellular & Developmental Biology**, v.32, n.4, p.272-289, Oct./Dec. 1996.
- HAMMATT, N.; DAVEY, M.R. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured zygotic embryos of soybean (*Glycine max* L. Merr.). **Journal of Plant Physiology**, v.128, n.3, p.219-226, May 1987.
- HANDRO, W.; RAO, P.S.; HARADA, H. A histological study of the development of buds, roots, and embryos in organ cultures of *Petunia inflata* R. Fries. **Annals of Botany**, v.37, p.817-821, 1973.
- HARTWECK, L.M.; LAZZERI, P.A.; CUI, D.; COLLINS, G.B.; WILLIAMS, E.G. Auxin-orientation effects on somatic embryogenesis from immature soybean cotyledons. In **Vitro Cellular & Developmental Biology**, v.24, n.8, p.821-828, Aug. 1988.
- HEPHER, A.; BOULTER, M.E.; HARRIS, N.; NELSON, R.S. Development of a superficial meristem during somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean (*Glycine max* L.). **Annals of Botany**, v.62, n.5, p.513-519, Nov. 1988.

- HINCHEE, M.A.W.; CONNAR-WARD, D.V.; NEWELL, C.A.; MC DONNELL, R.E.; SATO, J.J.; GASER, C.S.; FISCHOFF, D.A.; RE, D.B.; FRALEY, R.T.; HORSCH, R.B. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. **Bio/Technology**, v.6, n.8, p.915-922, Aug. 1988.
- HORRIDGE, G.A.; TAMM, S.L. Critical point drying for scanning electron microscopy study of ciliary motion. **Science**, v.163, n.3869, p.817-818, Feb. 1969.
- KALTCHUK-SANTOS, E.; MARIATH, J.E.; MUNDSTOCK, E.; HU, G.; BODANESE ZANETTINI, M.H. Cytological analysis of early microspore divisions and embryo formation in cultured soybean anthers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.49, p.107-115, 1997.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v.27, p.137-138, 1965.
- KLUGE, M.L.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Indução de embriões somáticos de soja utilizando sistema cíclico. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL 2., Gramado, 1997. **REDBIO: sub-região Brasil**; resumos. Gramado: 1997. p.127.
- KOMATSUDA, T. Somatic embryogenesis in soybean (*Glycine* species) In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Biotechnology in agriculture and forestry 31 - Somatic embryogenesis and synthetic seed II**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. cap. III.3, p.239-255.

KOMATSUDA, T.; OHYAMA, K. Genotypes of high competence for somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean *Glycine max*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.75; n.5, p.695-700, 1988.

KOMATSUDA, T.; KANEKO, K.; OKA, S. Genotype X sucrose interactions for somatic embryogenesis in soybean. **Crop Science**, v.31, n.1, p.333-337, Mar./Apr. 1991.

KOMATSUDA, T.; LEE, W.; OKA, S. Maturation and germination of somatic embryos as affected by sucrose and plant growth regulators in soybean *Glycine gracilis* Skvortz and *Glycine max* (L.) Merr. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.28, n.1, p.103-113, Jan. 1992.

LAZZERI, P.A.; HILDEBRAND, D.F.; COLLINS, G.B. A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.31, p.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**, v.10, n.3, p.197-208, 1987a.

LAZZERI, P.A.; HILDEBRAND, D.F.; COLLINS, G.B. Soybean somatic embryogenesis: effects of nutritional, physical and chemical. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.10, n.3, p.209-220, 1987b.

LAZZERI, P.A.; HILDEBRAND, D.F.; SUNEGA, J.; WILLIAMS, E.G.; COLLINS, G.B. Soybean somatic embryogenesis: interactions between sucrose and auxin. **Plant Cell Reports**, v.7, n.7, p.517-520, Dec. 1988.

- LI, J.; GRABAU, E.A. Comparison of somatic embryogenesis and embryo conversion in commercial soybean cultivars. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.44, n.1, p.87-89, Jan. 1996.
- LIPPMANN, B.; LIPPMANN, G. Induction of somatic embryos in cotyledonary tissue of soybean *Glycine max* L. Merr. **Plant Cell Reports**, v.3, n.6, p.215-218, Dec. 1984.
- LIU, C.; XU, Z.; CHUA, N.H. Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. **Plant Cell**, v.5, n.6, p.621-630, June 1993.
- LIU, W.; MOORE, P.J.; COLLINS, G.B. Somatic embryogenesis in soybean via somatic embryo cycling. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v.28p, n.3, p.153-160, July 1992.
- MAHESWARAN, G.; WILLIAMS, E.G. Origin and development of embryoids formed directly on immature embryos of *Trifolium repens* *in vitro*. **Annals of Botany**, v.56, n.5, p.619-630, Nov. 1985.
- MARCOS FILHO, J.; GODOY, O.P.; CÂMARA, G.M.S. Soja: produção, pré-processamento e transformação agroindustrial. **Extensão Agroindustrial**, v.7, p.98, 1987.
- MATSUMOTO, T.K.; WEBB, D.T.; KUEHNLE, A.R. Histology and origin of somatic embryos derived from *Anthurium andraeanum* Linden ex André Lamina. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.121, n.3, p.404-407, May 1996.

- MAURO, A.O.; BARALDI, G.L.; NÓBREGA, J.C.; COLLINS, G.B. Screening soybean genotypes for their ability to produce somatic embryos in tissue culture. **Científica**, v.24, n.1, p.149-158, 1996.
- MAURO, A.O.; PFEIFFER, T.; COLLINS, G.; VIEIRA, R.D. Estudo da interação entre genótipos e posições de explantes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) no meio de cultura para indução da embriogênese somática. **Científica**, v.22, n.1, p.133-144, 1994.
- MERKLE, S.A.; PARROTT, W.A.; FLINN, B.S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE, T.A. (Ed.) ***In vitro embryogenesis in plants***. London: Kluwer Academic, 1995. cap. 5, p.155-203.
- MUKHOPADHYAY, A.; ARUMUGAM, N.; NANDAKUMAR, P.B.A.; PRADHAN, A.K.; GUPTA, V.; PENTAL, D. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of oilseed *Brassica campestris*: transformation frequency is strongly influenced by the mode of shoot regeneration. **Plant Cell Reports**, v.11, n.10, p.506-513, Sept. 1992.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- NADOLSKA-ORCZYK, A.; ORCZYK, W. New aspects of soybean somatic embryogenesis. **Euphytica**, v.80, n.1/2, p.137-143, 1994.
- PARROTT, W.A. **Somatic embryogenesis of soybean**. <http://mars.cropsoil.uga.edu/homesoybean/somprot.htm>. (08 maio 1998).

- PARROTT, W.A.; DURHAM, R.E.; BAILEY, M.A. Somatic embryogenesis in legumes. In: BAJAJ, Y.P.S (Ed.) **Biotechnology in agriculture and forestry - 31 - Somatic embryogenesis and synthetic seed II**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. cap. , p. 200-227.
- PARROTT, 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**, v.16, n.1, p.15-21, 1989.
- PASSOS, I.R.S.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; VIEIRA, M.L.C. Embryogenic responses of *Vitis* spp.: effects of genotype and polyvinylpyrrolidone. **Vitis**, v.38, n.2, p.47-50, 1999.
- PEETZS, V.S. Soja. **Informações Econômicas**, v.29, n.3, p.39-40, mar. 1999.
- RANCH, J.P.; OGLESBY, L.; ZIELINSKI. Plant regeneration from embryo-derived tissue cultures of soybeans. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v.21, n.11, p.653-658, Nov. 1985.
- RODRIGUEZ, A.P.M.; WETZSTEIN, H.Y. The effect of auxin type and concentration on pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryo morphology and subsequent conversion into plants. **Plant Cell Reports**, v.13, n.11, p.607-611, Aug. 1994.
- RODRIGUEZ, A.P.M.; WETZSTEIN, H.Y. A morphological and histological comparison of the initiation and development of pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryogenic cultures induced with naphthaleneacetic acid or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Protoplasma**, v.204, p. 71-83, 1998.

- SAKAI, W.S. Simple method for differential staining of parafilm embeded plant material using toluidine blue 01. **Stain Technology**, v.48, p. 247-249, 1973.
- SANTARÉM, E.R. Embriogênese somática e organogênese em soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Porto Alegre, 1992. 129p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- SANTAREM, E.R.; PELLISSIER, B.; FINER, J.J. Effect of explant orientation, pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v.33, n.1, p.13-19, Jan./Mar. 1997.
- SANTOS, A.V.P. dos; CUTTER, E.; DAVEY, M.R. Origin and development of somatic embryos in *Medicago sativa* L. (Alfafa). **Protoplasma**, v.117, p.107-115, 1983.
- SANTOS, K.G.B.; MUNDSTOCK, E.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Genotype-specific normalization of soybean somatic embryogenesis through the use of an ethylene inhibitor. **Plant Cell Reports**, v.16, n.12, p.859-864, Oct. 1997.
- SHOEMAKER, R.C.; AMBERGER, L.A.; PALMER, R.G.; OGLESBY, L.; RANCH, J.P. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentration on somatic embryogenesis and heritable variation in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v.27, p.84-88, Apr. 1991.

- SUHASINI, K.; SAGARE, A.P.; KRISHNAMURTHY, K.V. Study aberrant morphologies and lack of conversion of somatic embryos of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v.32, n.6, p.6-10, Jan./Mar. 1996.
- THOMÉ, G.C.H.; SANTARÉM, E.R.; FERREIRA, A.G. Adventitious bud induction and plant regeneration from soybean cotyledonary nodes. **Phyton**, v.57, p.127-135, 1995.
- TIAN, L.N.; BROWN, D.C.W.; VOLDENG, H.; WEBB, J. *In vitro* response and pedigree analysis for somatic embryogenesis of long-day photoperiod adapted soybean. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.36, n.2, p.269-273, Feb. 1994.
- WETZSTEIN, H.Y.; BAKER, C.M. The relationship between somatic embryo morphology and conversion in peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant Science**, v. 92, n.1, p. 81-89, 1993.
- WILLIAMS, E.G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, v.57, n.4, p.443-462, Apr. 1986.
- YUQING, F.; LUCCHIN, M.; LUPOTTO, E. Rapid and efficient regeneration from cotyledonary explants of soybean cultivars (*Glycine max* L.). **Journal Genetics & Breeding**, v.49, n.4, p.339-342, Dec. 1995.

ZARKADAS, C.G.; VOLDENG, H.D.; YU, Z.R. **Genetic improvement in soybean protein quality:** advances in research. <http://res.agr.ca/PUB/ecorc/program1/research/advances/res-23.htm>. (24 out. 1997).

ZIMMERMAN, J.L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, v.5, n.10, p.1411-1423, Oct. 1993.

ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Massa de matéria fresca dos calos para os genótipos de soja PI 123439 e BR 8014853 aos 14º e 28º dias em meio MSB suplementado com 0,8 mg.L⁻¹ de 2,4-D.

Figura 2. Número médio de protuberâncias por explante cotiledonar do genótipo de soja PI 123439 aos 14º e 28º dias em meio MSB suplementado com três concentrações de 2,4-D (0,8; 2,0 e 5,0 mg.L⁻¹).

Figura 3. Número médio de protuberâncias por explante cotiledonar do genótipo de soja PI 123439 aos 14º e 28º dias suplementado com três concentrações de 2,4-D (0,8; 2,0 e 5,0 mg.L⁻¹).

Figura 4. Número dos diferentes tipos morfológicos de embriões somáticos de soja ('Williams 82') obtidos a partir da indução em meio MSB suplementado com 40,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D.

Figura 5. *Glycine max* (L.) Merrill - PI 123439 - Explantes cotiledonares após 45 dias em meio MSB suplementado com $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D. **A.** A seta menor indica estruturas globulares formadas sobre a superfície do explante; a seta maior indica um embrião somático localizado na extremidade do explante (barra = 4,5 mm). **B.** Corte longitudinal de estruturas globulares evidenciadas anteriormente pela seta menor (barra = $198,9 \text{ }\mu\text{m}$). **C.** Detalhe da diferenciação vascular (seta) observada entre as células meristemáticas (barra = $73,7 \text{ }\mu\text{m}$).

Figura 6. *Glycine max* (L.) Merrill - PI 123439 - Explantes cotiledonares após 42 dias em meio MSB suplementado com 0,8 mg.L⁻¹ de 2,4-D. **A.** Detalhe de um explante cotiledonar mostrando o desenvolvimento de estruturas alongadas ao longo da superfície do explante que, posteriormente, se diferenciavam em raízes (barra = 1,3 mm). **B.** Visão geral dos explantes cotiledonares em condições de cultura. A seta indica uma das raízes que se originou das estruturas observadas em A (barra = 6,7 mm).

A

B

Figura 7. *Glycine max* (L.) Merrill - PI 123439 - **A.** Eletromicrografia de varredura mostrando uma estrutura globular em uma das extremidades do explante cotiledonar (barra = 200 μm). **B.** Corte longitudinal de uma estrutura globular similar a observada em A evidenciando a continuidade da epiderme desta estrutura e a do explante (barra = 275 μm). **C.** Corte longitudinal de um embrião somático em estágio inicial de desenvolvimento, originado a partir de uma estrutura semelhante à observada em B (barra = 275 μm). **D.** Corte longitudinal de uma estrutura globular evidenciando a região de vascularização (seta) (barra = 51 μm). **E.** Corte longitudinal de estruturas semelhantes às observadas na Figura 6A. Verifica-se a conexão vascular da estrutura com o explante (barra = 275 μm). **F.** Corte longitudinal de uma raiz originada de uma estrutura similar à mostrada em E (barra = 555,6 μm).

Figura 8. *Glycine max* (L.) Merrill - PI 123439 - Embriões somáticos coletados aos 26 dias em meio MSB suplementado com $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D. **A.** Eletromicrografia de varredura de um embrião somático localizado em uma das extremidades do explante cotiledonar (barra = $178,5 \text{ }\mu\text{m}$). **B.** Eletromicrografia de varredura caracterizando o processo de embriogênese secundária em que dois embriões somáticos secundários originam-se na base de um embrião somático primário (seta) (barra = $454,5 \text{ }\mu\text{m}$). **C.** Detalhe do ponto de ligação entre um embrião somático secundário e o embrião somático primário mostrado em B (barra = $333,3 \text{ }\mu\text{m}$). O detalhe da região indicada na figura mostra a presença de um meristema apical caulinar, confirmando a natureza embrionária da estrutura (barra = $83,3 \text{ }\mu\text{m}$). **D.** Corte longitudinal da porção basal de um embrião somático primário mostrando o ponto de ligação do embrião somático secundário (seta) (barra = $552,4 \text{ }\mu\text{m}$). **E.** Corte longitudinal de um embrião somático, similar ao mostrado em A, exibindo estruturas cotiledonares múltiplas. As pontas de seta indicam áreas meristemáticas entre as estruturas cotiledonares (barra = $552,4 \text{ }\mu\text{m}$).

Figura 9. *Glycine max* (L.) Merrill - Células do eixo embrionário de embriões maduros exibindo grande acúmulo de grãos de amido (evidenciados sob luz polarizada) ao redor do núcleo. Esta característica era comum ao genótipo PI 123439 e 'Williams 82' (barra = 51 μm). -011

Figura 10. *Glycine max* (L.) Merrill - PI 123439 - Explantes cotiledonares imaturos coletados aos 40 dias em meio MSB suplementado com $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D. **A.** Embrião somático multicotiledonar localizado em uma das extremidades do explante (barra = $450 \mu\text{m}$). **B.** Corte longitudinal de um embrião somático, similar ao mostrado em A; a seta indica a região de contato do embrião somático com o explante. Verifica-se também a formação de cotilédones múltiplos e de áreas meristemáticas entre as estruturas cotiledonares (pontas de seta) (barra = $410 \mu\text{m}$). **C.** Detalhe do ponto de ligação entre outro explante e o embrião somático originado a partir dele (seta) (barra = $450 \mu\text{m}$). **D.** Corte longitudinal de um embrião somático de 'Williams 82' aos 45 dias em meio MSB contendo 0,5% de carvão ativado mostrando similaridade entre as máis-formações de ambos os genótipos (barra = $322 \mu\text{m}$). **E.** Embriões somáticos secundários originando-se a partir de um embrião somático primário (seta) (barra = $450 \mu\text{m}$). **F.** Corte longitudinal de um embrião somático similar ao observado em E. A seta indica um embrião somático secundário conectado ao embrião somático primário, porém com sistema vascular próprio (barra = $620 \mu\text{m}$).

Figura 11. *Glycine max* (L.) Merrill - PI 123439 - Explantes cotiledonares aos 42 dias em meio MSB suplementado com 40,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D. **A.** Os explantes tornam-se amarelados formando uma massa de calo friável de aspecto gelatinoso a qual não desenvolve qualquer estrutura embriogênica (barra = 20 mm). **B.** Corte longitudinal do explante semelhante ao mostrado em A. Observa-se uma proliferação celular caracterizando um arranjo frouxo entre as células. Algumas células apresentam-se altamente vacuolizadas, outras plasmolisadas e colapsadas (barra = 73,7 µm).

Figura 12. *Glycine max* (L.) Merrill - **A.** Explantes cotiledonares obtidos a partir de embriões zigóticos imaturos do genótipo PI 123439 aos 45 dias em meio MSB contendo 0,5% de carvão ativado na ausência de 2,4-D. Observar a formação de raízes e ausência de qualquer estrutura semelhante a embrião (barra = 10 mm). **B.** Explante cotiledonar obtido a partir de embrião zigótico imaturo de 'Williams 82' aos 45 dias em meio MSB contendo 0,5% de carvão ativado na ausência de 2,4-D. Verificarr a presença de vários embriões somáticos sobre a superfície do explante (barra = 870 μ m).

A

Figura 13. *Glycine max* (L.) Merrill - 'Williams 82' - **A-C.** Embriões somáticos pré-globulares originados a partir de divisões celulares nas camadas subepidérmicas do mesofilo cotiledonar. Essas estruturas originaram-se independentemente (A e B) (barras = 102 μm) ou muito próximas (C) (barra = 275 μm). **D-E.** Embriões somáticos cordiformes (barras = 275 μm). **F.** Embrião somático em estágio torpedo (barra = 275 μm).

Figura 14. *Glycine max* (L.) Merrill - 'Williams 82' - **A.** Corte longitudinal de embriões somáticos em estágio torpedo de desenvolvimento mostrando a independência vascular em relação ao tecido do explante (barra = 275 μ m). **B.** Corte longitudinal de um embrião somático ligado ao explante pelo eixo hipocotiledonar (barra = 275 μ m). **C.** Corte longitudinal de embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento. Verifica-se uma assincronia do processo de embriogênese somática (barra = 275 μ m). A seta indica o início da formação de um embrião somático cuja origem é multicelular a partir de divisões das camadas subepidérmicas do explante (detalhe) (barra = 102 μ m).

Figura 15. *Glycine max* (L.) Merrill - 'Williams 82' - **A.** Corte transversal de um embrião somático globular mostrado em C (seta menor) (barra = 198,9 μm). **B.** Corte longitudinal de um embrião somático em estágio torpedo de desenvolvimento similar ao indicado pela seta maior em C (barra = 198,9 μm). **C.** Visão geral de um explante cotiledonar aos 26 dias em meio MSB contendo 0,5% de carvão ativado. Verifica-se uma assincronia do processo embriogênico caracterizada pela presença de embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento (barra = 384 μm).

Figura 16. *Glycine max* (L.) Merrill - 'Williams 82' - Eletromicrografia de varredura de embriões somáticos do tipo corneta em diferentes estágios de desenvolvimento. As setas indicam a ausência do meristema apical caulinar (barra = 156,2 μm).

Figura 17. *Glycine max* (L.) Merrill - 'Williams 82' - **A-D.** Diferentes estágios de desenvolvimento de alguns dos tipos morfológicos dos embriões somáticos induzidos em meio MSB suplementado com 40,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D. **A.** Embriões somáticos caracterizados como cornetas. **B.** Embriões somáticos exibindo estruturas cotiledonares múltiplas. **C.** Embriões somáticos monocotiledonares. **D.** Embriões somáticos anisocotiledonares (barras = 0,3 mm).

Figura 18. *Glycine max* (L.) Merrill - 'Williams 82' - **A.** Embrião somático caracterizado como corneta coletado aos 45 dias do meio MSB contendo 0,5% de carvão ativado (barra = 870 μm). **B.** Corte longitudinal do embrião somático mostrado em A. Observa-se ausência de um meristema apical caulinar (barra = 620 μm). **C.** Embrião somático similar ao mostrado em A e B após cerca de 15 dias em meio de germinação MSB contendo 3% de sacarose. Observa-se a raiz primária bem desenvolvida com várias raízes laterais. Não ocorre o desenvolvimento da parte aérea, pois não há formação de meristema apical caulinar como observado em B (barra = 7,3 mm).

Figura 19. *Glycine max* (L.) Merrill - 'Williams 82' - **A.** Plântula originada a partir de um embrião somático multicotiledonar, similar ao mostrado na Figura 20A (asterisco), colocado em meio de germinação MSB contendo 3% de sacarose (barra = 11 mm). **B.** Corte longitudinal do embrião somático mostrado na Figura 20A (asterisco) apresentando um meristema apical caulinar (seta) (barra = 294 μ m).

Figura 20. *Glycine max* (L.) Merrill - 'Williams 82' - **A.** Embriões somáticos multicotiledonares coletados aos 45 dias do meio MSB contendo 0,5% de carvão ativado (barra = 870 μm). **B.** Corte longitudinal do embrião somático, similar ao indicado em A pela seta. Observa-se uma vascularização irregular ao longo do eixo hipocotiledonar; entretanto, o meristema apical caulinar não pode ser identificado (barra = 620 μm). **C.** Plântula originada lateralmente no embrião somático multicotiledonar apresentando sistemas radicular e caulinar independentes.

Figura 21. *Glycine max* (L.) Merrill - 'Williams 82' - **A.** Embriões somáticos anisocotiledonares coletados aos 45 dias em meio MSB contendo 0,5% de carvão ativado. Observa-se a formação de um cotilédone maior em relação ao outro (barra = 870 μ m). **B.** Corte longitudinal do embrião somático semelhante ao mostrado em A. Evidencia-se o aspecto morfológico dos cotilédones, sendo um deles rudimentar (barra = 620 μ m). **C.** Plântula originada a partir de um embrião somático similar ao mostrado em A (barra = 5,6 mm).

Figura 22. *Glycine max* (L.) Merrill - 'Williams 82' - **A.** Embriões somáticos monocotiledonares coletados aos 45 dias em meio MSB contendo 0,5% de carvão ativado (barra = 870 μm). **B.** Corte longitudinal do embrião somático monocotiledonar semelhante ao mostrado em A. Observar a presença de um meristema apical radicular porém, não é possível distinguir neste plano de corte o meristema apical caulinar (barra = 620 μm). **C.** Plântula originada de um embrião somático monocotiledonar semelhante ao observado em A (barra = 5,6 mm).

Figura 23. *Glycine max* (L.) Merrill - 'Williams 82' - **A.** Plântula originada de um embrião somático multicotiledonar aos 20 dias em meio de germinação MSB contendo 3% de sacarose (barra = 11 mm). **B.** Plântula com 25 dias após ser retirada do meio de germinação. Observa-se uma dupla ramificação da parte aérea (barra = 19,2 mm). **C.** Planta já aclimatada em condições de campo (barra = 37,3 mm). **D.** Detalhe da planta na fase reprodutiva com flores e frutos desenvolvidos (barra = 13 mm).