

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN/RESEARCH ARTICLE

INDUÇÃO E HISTOLOGIA DE EMBRIÕES SOMÁTICOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS DO HÍBRIDO *Phalaenopsis* CLASSIC SPOTTED PINK (ORCHIDACEAE)

Induction and Histology of Primary and Secondary Somatic Embryos of *Phalaenopsis* Hybrid Classic Spotted Pink (Orchidaceae)

Inducción e histología de embriones somáticos primarios y secundarios del híbrido Classic Spotted Pink (Orchidaceae)

Cláudia ULISSES¹; João Alves Ferreira PEREIRA²; Simone Sampaio SILVA²; Emília ARRUDA³; Marciana MORAIS⁴.

¹ Departamento de Biologia, Área Botânica, Prédio Dárdano de Andrade Lima, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos. Recife, Pernambuco, Brasil.

² Departamento de Biologia, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos. Recife, Pernambuco, Brasil.

³ Centro de Biociências, Departamento de Botânica, Área Anatomia Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco. Av. Professor Moraes Rego, 1235-Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil.

⁴ Centro de Biociências, Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas, Universidade Federal de Pernambuco. Av. Professor Moraes Rego, 1235-Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil.

For correspondence. claulisses@gmail.com

Received: 21st October 2015, **Returned for revision:** 22nd February 2016, **Accepted:** 14th March 2016.

Associate Editor: Cristiano Buzatto.

Citation/Citar este artículo como: Ulisses C, Pereira JAF, Silva SS, Arruda E, Moraes M. Indução e histologia de embriões somáticos primários e secundários do híbrido *Phalaenopsis* Classic Spotted Pink (Orchidaceae). Acta biol. Colomb. 2016;21(3):571-580. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v21n3.50032>

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos induzir a formação de embriões somáticos *in vitro* no híbrido *Phalaenopsis* Classic Spotted Pink, utilizando diferentes meios nutritivos e avaliar a morfologia interna desses embriões por meio de análises histológicas e histoquímicas. Folhas jovens de plantas cultivadas *in vitro* foram utilizadas como explantes para indução de embriões somáticos em diferentes meios nutritivos: New Dogashima Medium, contendo ANA (0,537µM) e BAP (4,440µM), acrescido de phytigel e com pH 5,8 (NDM) e o Murashige & Skoog com a metade da concentração dos sais, acrescido de ANA (0,537µM) e TDZ (13,621µM), gelificado com gelrite e o pH 5,2 (½ MS). Embriões somáticos primários foram obtidos aos 90 dias de cultivo no meio ½MS e foram transferidos para o mesmo meio para obtenção de embriões secundários. Os embriões somáticos primários e secundários foram subcultivados para meio MS com metade da concentração de sais, sem fitoregulador submetidos a fotoperíodo de 16 horas, o qual estimulou a produção de clorofila tanto nos embriões primários como secundários, promovendo o desenvolvimento desses em protocormos e posteriormente em plantas. As análises histológicas demonstraram que os embriões somáticos foram formados diretamente das camadas epidérmicas dos explantes, sem passar pela fase de calo, caracterizando embriogênese somática direta. Os métodos histoquímicos utilizados possibilitaram evidenciar a deposição de amido e lipídeos nas células embriogênicas em decorrência de mecanismos fisiológicos, permitindo o desenvolvimento dos embriões primários e secundários em plantas. Portanto, o meio ½ MS acrescido de ANA (0,537µM) e TDZ (13,621µM), gelificado com gelrite e o pH 5,2 promoveu a obtenção de embriões primários e secundários com capacidade para regenerar plantas apresentando características morfológicas semelhantes a planta matriz.

Palavras-chave: anatomia, cultivo *in vitro*, histoquímica, orquídea.



ABSTRACT

The present work had as objectives to induce the formation of somatic embryos *in vitro* on *Phalaenopsis* hybrid Classic Spotted Pink, using different nutrient medium and assess the internal morphology of these embryos by means of histological and histochemical analysis. Young leaves of plants grown *in vitro* were used as explants for induction of somatic embryos in different nutrient medium: New Dogashima Medium, containing ANA (0.537 μM) and BAP (4.440 μM) plus phytigel and with pH 5.8 (NDM) and the Murashige & Skoog with half the concentration of salts, plus NNA (0.537 μM) and TDZ (13.621 μM), jellied with gelrite and pH 5.2 (0.5 MS). Primary somatic embryos were obtained to 90 days of cultivation in half MS and have been transferred to the same means for obtaining of secondary embryos. The primary and secondary somatic embryos were subcultured for MS with half the concentration of salts, without fitoregulator subjected to photoperiod of 16 hours, which stimulated the production of chlorophyll in primary embryos as secondary, promoting the development of those in protocorms and later in plants. The histological analysis showed that the somatic embryos were formed directly from the epidermal layers of the explants, without going through the phase of callus, featuring direct somatic embryogenesis. The histochemical methods used made it possible to highlight the deposition of starch and lipids in cells embriogenics as a result of physiological mechanisms, enabling the development of primary and secondary embryos in plants. Therefore, the medium 0.5 MS Plus ANA (0.537 μM) and TDZ (13.621 μM), jellied with gelrite and pH 5.2 promoted to obtain primary and secondary embryos with ability to regenerate plants showing morphological similar the mother plant.

Keywords: anatomy, histochemistry *in vitro* cultivation, orchid.

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivos inducir la formación de embriones somáticos *in vitro* en el híbrido *Phalaenopsis* Classic Spotted Pink, utilizando diferentes medios nutritivos, y evaluar la morfología interna de estos embriones mediante análisis histológico e histoquímico. Hojas jóvenes de plantas cultivadas *in vitro* se utilizaron como explantes para la inducción de embriones somáticos en diferentes medios nutritivos: New Dogashima Medium, contenido de ANA (0.537 mM) y BAP (4.440 μM) además de phytigel y con pH 5.8 (NDM) y el Murashige Skoog con la mitad de la concentración de sales, además de ANA (0.537 μM) y TDZ (13.621 μM), gelificado gelrite y pH 5.2 ($\frac{1}{2}$ MS). Se obtuvieron embriones somáticos primarios a los 90 días de cultivo en el medio $\frac{1}{2}$ MS y a estos se les transfirió al mismo medio ($\frac{1}{2}$ MS) para la obtención de embriones secundarios. Los embriones somáticos primarios y secundarios fueron subcultivados para MS con la mitad de la concentración de sales, sin reguladores de crecimiento y sometidos a fotoperiodo de 16 horas, lo que estimuló la producción de clorofila tanto en los embriones primarios como en los secundarios, promoviendo el desarrollo de los protocormos y más tarde en las plantas. Los análisis histológicos demostraron que los embriones somáticos fueron formados directamente en las capas epidérmicas de los explantes, sin pasar por la fase de callo, vía embriogénesis somática directa. Los métodos histoquímicos hicieron posible destacar la deposición de almidón y lípidos en las células embriogénicas como resultado de mecanismos fisiológicos, que permiten el desarrollo de los embriones primarios y secundarios en las plantas. Por lo tanto, el medio $\frac{1}{2}$ MS contenido de ANA (0.537 μM) y TDZ (13.621 μM), con gelrite y pH 5.2 permitió obtener embriones primarios y secundarios con capacidad para regenerar plantas con caracteres morfológicos similares a los de la planta matriz.

Palabras clave: anatomía, cultivo *in vitro*, histoquímica, orquídea.

INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae pertencente à ordem Asparagales é considerada a maior família em número de espécies de monocotiledôneas (Stevens, 2001), No Brasil, ocorrem 2440 espécie, agrupadas em 240 gêneros, com cerca de aproximadamente 1635 espécies endêmicas (Barros *et al.*, 2013).

As orquídeas possuem uma distribuição cosmopolita (Batista *et al.*, 2005), apresentando indivíduos de hábitos terrestres, epífitos, rupícolas, saprofíticos (Shiraki e Diaz, 2012) e subterrâneos (Raven *et al.*, 2014).

Dentre as orquídeas, o gênero *Phalaenopsis* está entre os mais populares e de maior valor comercial (Lee, 2011), compreende cerca de 66 espécies, em sua maioria epífitas, monopodiais e com folhas suculentas (Tsai *et al.*, 2003). Apresentam colorações, tamanhos e formatos variados provenientes do processo de hibridação, com excelente aceitação no mercado de flores, pois responde bem à

indução floral e possui flores com uma longa durabilidade, podendo durar até três meses (Vaz e Kerbaux, 2005; Lee, 2011). Sua propagação vegetativa é lenta, pois a formação de brotos laterais não é comum, sendo a reprodução por sementes a mais utilizada (Minamiguchi e Machado Neto, 2007). As mudas provenientes de sementes não apresentam uma uniformidade morfológica e genética, dessa forma as plantas produzidas vegetativamente podem oferecer maior fidelidade genética (Ishii *et al.*, 1998). Por se tratar de uma planta monopodial, a utilização do ápice caulinar contendo o meristema apical para induzir a propagação vegetativa *in vitro*, promove a morte da planta. Sendo assim, se faz necessário à indução da morfogênese *in vitro* a partir de regiões da planta que não comprometam ou impossibilitem a existência da planta matriz (Minamiguchi e Machado Neto, 2007).

A embriogênese somática (ES) conhecida também como embriogênese adventícia ou assexual, é uma técnica de

micropropagação que vem sendo utilizada por muitas espécies de plantas. A ES consiste no processo em que células haploides ou somáticas passam por diferentes estádios embriogênicos dando origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas (Williams e Maheswaran, 1986). Esse processo pode ocorrer por via direta ou indireta. A embriogênese por via direta, ocorre quando a primeira expressão morfogênica é o surgimento de estruturas globulares diretamente no explante, as quais apresentam-se geralmente brancas e translúcidas, caracterizando em embriões somáticos. Enquanto a embriogênese somática indireta, inicia-se com uma diferenciação das células do explante formando calos, que são normalmente brancos e translúcidos, convencionalmente designados de massas ou complexos celulares pró-embriogênicos, os quais se dividem e formam embriões somáticos (Guerra *et al.*, 1999).

Independentemente do padrão direto ou indireto, as células-mães embriogênicas apresentam um conjunto de características comuns ao comportamento de células embrionárias em processo de divisão. Estas características incluem o tamanho pequeno (100-200µm) das células, conteúdo citoplasmático denso, apresentando núcleo com volume considerado em relação as outras organelas celulares e com nucléolos proeminentes, vacúolos pequenos, caracterizando células jovens e presença de grãos de amido. As propriedades histoquímicas destas células sugerem intensa atividade metabólica e de síntese de RNA (Guerra *et al.*, 1999).

A embriogênese somática secundária (ESS) ocorre quando novos embriões são formados a partir de embriões somáticos primários (Uzelac *et al.*, 2007; Karami *et al.*, 2008). Há algumas vantagens nesse processo quando comparado à embriogênese somática primária, tais como: a taxa elevada de multiplicação, a independência de uma fonte de explante e a repetibilidade de formação de embriões (Vasic *et al.*, 2001).

Desse modo, a embriogênese somática, como técnica para propagação clonal, tem sido tema de diferentes estudos, em especial, com abordagens morfológicas e histológicas, para melhor entendimento da caracterização das estruturas iniciais e do desenvolvimento embriogênico em plantas superiores (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006). Para compreender e avaliar a formação e a viabilidade dos embriões somáticos, se faz necessário identificar a ultraestrutura dos mesmos por meio de análises histológicas e histoquímicas.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo induzir a formação de embriões somáticos *in vitro* no híbrido *Phalaenopsis* Classic Spotted Pink, utilizando meios nutritivos capazes de induzir ES no gênero *Phalaenopsis*, e

avaliar a morfologia interna desses embriões somáticos por meio de análises histológicas e histoquímicas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Indução de embriogênese primária

Inicialmente foram utilizadas folhas jovens, com tamanho aproximado de 3 cm, de plantas cultivadas *in vitro* do híbrido *Phalaenopsis* Classic Spotted Pink, mantidas *in vitro* por 90 dias. Foram retiradas as bordas das folhas deixando segmentos de aproximadamente 1 cm².

Foram estabelecidos dois tratamentos, segundo as metodologias adotadas por Minamiguchi e Machado Neto (2007) e Chen e Chang (2006) (Tabela 1) para algumas espécies do gênero *Phalaenopsis*. A metodologia proposta por Minamiguchi e Machado Neto (2007), utiliza o meio NDM (New Dogashima Medium) (Tokuhara e Mii, 1993) contendo ANA (0,537µM) e BAP (4,440µM), acrescido de phytigel e com pH 5,8, denominado Meio NDM e a metodologia proposta por Chen e Chang (2006) faz uso do meio MS (Murashige e Skoog, 1962), com a metade da concentração dos sais, acrescido de ANA (0,537µM) e TDZ (13,621µM), gelificado com gelrite e o pH 5,2, denominado meio ½ MS). Cada tratamento continha 20 repetições e cada repetição foi composta de um tubo de ensaio contendo uma secção foliar inoculada em 20 mL do meio nutritivo. O experimento foi conduzido em sala de crescimento do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da UFRPE, sob temperatura de 25 ± 2 °C em ausência de luz durante 90 dias.

Indução de embriogênese somática secundária

Aos 90 dias as estruturas morfogênicas formadas a partir do explante foliar no tratamento ½MS, foram separadas do explante indutor, com cuidado para não ocasionar ferimentos ou danificar as estruturas, utilizando o auxílio de um bisturi e foram inoculadas no mesmo meio indutor ½MS, permanecendo ainda no escuro por mais 60 dias para induzir a formação de embriões somáticos secundários (ESS). Posteriormente, os embriões (primários e secundários) foram transferidos para o meio MS com metade da concentração de sais, na ausência de fitoregulador, e submetidos a um fotoperíodo de 16 horas fornecido por lâmpadas fluorescentes brancas com intensidade luminosa de 42 µmol. m² s⁻¹

Análise histológica dos embriões somáticos

Para avaliação da morfologia interna em microscopia óptica, foram retiradas amostras de explantes com a

Tabela 1. Descrição dos meios nutritivos de indução de embriogênese somática em folhas do híbrido *Phalaenopsis* Classic Spotted Pink.

Meios Nutritivos	Fitorreguladores	Agente gelificante	pH	Metodologias utilizadas
NDM	ANA (0,537µM) e BAP (4,440µM)	Phytigel	5.8	Minamiguchi e Machado (2007)
½ MS	ANA (0,537µM) e TDZ (13,621µM)	Gelrite	5.2	Chen e Chang (2006)

presença de estruturas morfogênicas obtidas durante o processo de indução de embriogênese somática primária e secundária. As amostras foram fixadas em FAA 70 por 72 horas e preservadas em álcool etílico 70 % (Johansen, 1940). Posteriormente, o material foi desidratado em série etílica (70 % a 100 %), imersos em xilol, emblocados em parafina e seccionado em micrótomo rotativo (MRP09 LUPETEC), com secções longitudinais, variando entre 5 a 8 μm de espessura. As secções obtidas foram submetidas à dupla coloração composta por Azul de Alcian e Safranina (1:1, v/v) e montados em lâminas permanentes com bálsamo do Canadá (Bukatsch, 1972). A análise e o registro fotográfico dos caracteres anatômicos mais relevantes, foram realizados em microscópio óptico *Top Light B2*, utilizando-se o software BEL Microlmage Analyser.

Para a identificação de algumas substâncias nas secções histológicas, foram realizados testes histoquímicos utilizando os seguintes reagentes: sudan IV, para evidenciar e localizar substâncias lipídicas (Pearse, 1961); lugol, para detectar amido (Jensen, 1962) e cloreto férrico, para verificar a presença de compostos fenólicos (Johansen, 1940). As imagens foram registradas em microscópio de luz (COLEMAN).

O processamento histológico foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da UFRPE e os testes histoquímicos foram realizados no Laboratório de Anatomia Vegetal pertencente à UFPE.

RESULTADOS

Indução de embriogênese somática primária.

No meio nutritivo NDM durante toda fase de indução de embriões somáticos, não apresentou formação de estruturas morfogênicas, ocorrendo oxidação e necrose completa dos explantes foliares.

Aos 25 dias de cultivo ocorreu o surgimento de pequenas estruturas arredondadas na face adaxial de explantes foliares no meio $\frac{1}{2}$ MS. Tais estruturas se apresentavam mais evidentes sobre o explante aos 45 dias de cultivo, demonstrando morfogênese direta (Fig. 1A), uma vez que não foi visualizada a presença de calo.

Aos 50 dias de cultivo foi possível verificar um crescimento e desenvolvimento das estruturas morfogênicas, bem como o surgimento de novas estruturas em diversos estádios de desenvolvimento, por toda extensão do explante foliar (Fig. 1B), tanto na face adaxial como abaxial (Fig. 1C).

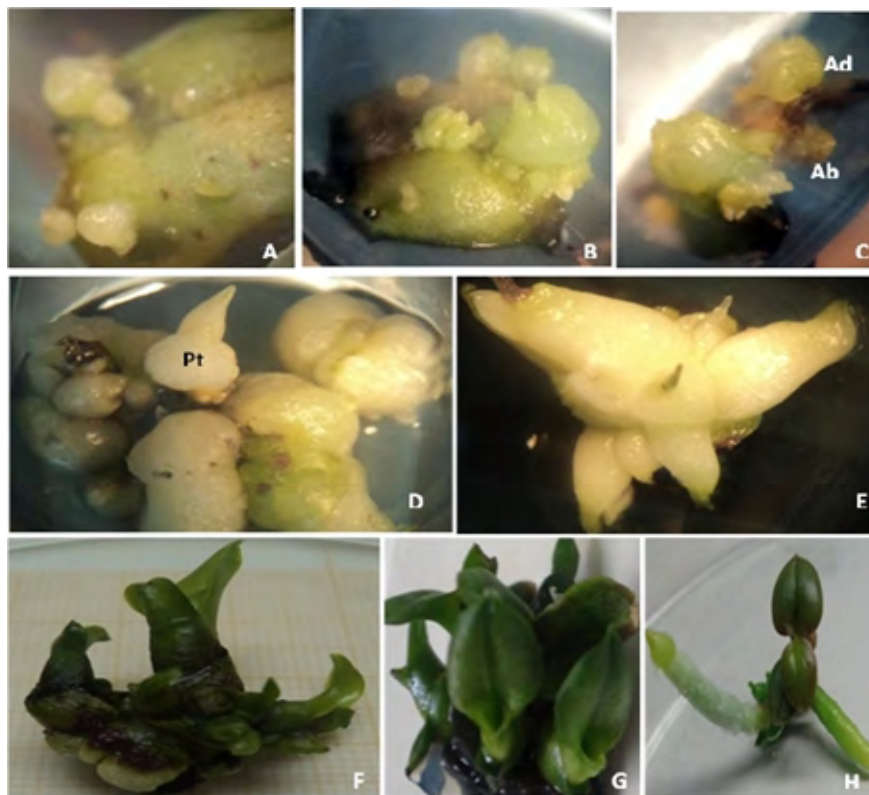


Figura 1. Desenvolvimento de embriões somáticos do híbrido *Phalaenopsis* Classic Spotted Pink. A). Embriões somáticos aos 45 dias de cultivo no meio MS (Murashige e Skoog, 1962), com a metade da concentração dos sais, acrescido de ANA (0,537 μM) e TDZ (13,621 μM), gelificado com gelrite e o pH 5,2 (Meio $\frac{1}{2}$ MS); B). Embriões somáticos formados na face adaxial do explante foliar aos 50 dias no meio $\frac{1}{2}$ MS; C). Visão lateral do explante foliar contendo embriões somáticos na face adaxial (ad) e abaxial (ab), aos 50 dias no meio $\frac{1}{2}$ MS; Embriões somáticos primários e secundários, evidenciando um protocormo (Pt); E). Embriões primários e secundários desenvolvendo parte aérea aos 15 dias em exposição à luz (15x); F). Conversão dos embriões primários e secundários em plântula aos 30 dias em exposição à luz; G). Desenvolvimento de parte aérea das plântulas provenientes de embriões somáticos primários e secundários; H). Planta proveniente de embrião somático apresentando brotação lateral (seta).

Indução de embriogênese somática secundária.

Aos 60 dias de indução da ESS, observou-se a formação de embriões somáticos secundários em estágio avançado de desenvolvimento, tendo a aparência semelhante a um protocormo aclorofilado devido ao cultivo na ausência de luz (Fig. 1D).

Aos 15 dias de cultivo com luz, parte dos embriões somáticos (primários e secundários) apresentavam em estágio avançado de desenvolvimento, evidenciando os primórdios foliares no ápice do eixo caulinar (Fig. 1E). Na presença da luz, esses embriões começaram a produzir clorofila e consequentemente o desenvolvimento da parte aérea aos 30 dias de exposição à luz (Fig. 1F). Aos 45 dias esses embriões desenvolveram-se em plântulas com folhas bem desenvolvidas (Fig. 1G), bem como o sistema radicular (Fig. 1H).

Análise histológica e histoquímica dos embriões somáticos

As análises histológicas permitiram evidenciar o início da formação dos embriões somáticos diretamente sob a superfície do explante foliar. Este início de formação é caracterizado por um aglomerado de células que se desdiferenciaram em células meristemáticas e que se encontram em constante divisão na superfície epidérmica do explante (Figs. 2A-2B). Foi observada a formação das estruturas morfogênicas tanto na face adaxial como na face abaxial do explante (Fig. 2B).

As células-mães embriogênicas apresentavam-se em constantes divisões periclinais e anticlinais, e com as seguintes características meristemáticas: tamanho

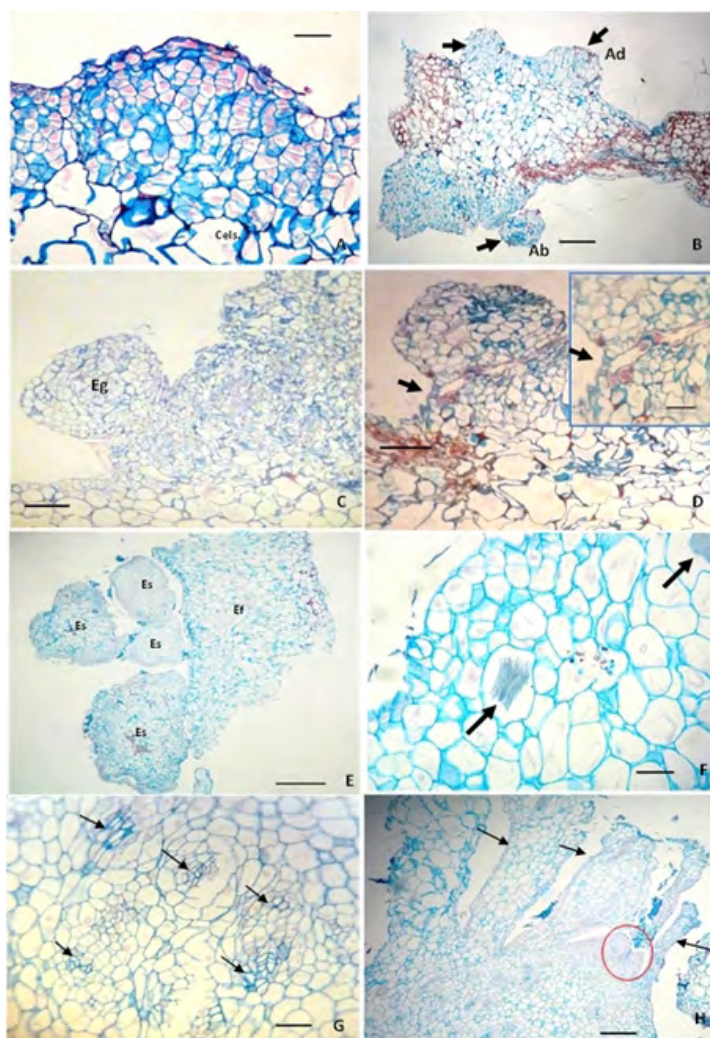


Figura 2. Desenvolvimento dos embriões somáticos na epiderme foliar de *Phalaenopsis* Classic Spotted Pink. A). Células da superfície foliar em divisão periclinal (início da formação do embrião somático); B). Formação de embriões somáticos (setas) na face adaxial (ad) e abaxial (ab) do explante foliar; C). Formação de embrião somático globular (Eg); D). Embrião somático globular apresentando uma estrutura semelhante a um “suspensor” (seta). Detalhe da estrutura semelhante a um “suspensor” em embrião somático (seta) Barra= 150 µm; E). Embriões somáticos (Es) formados na superfície do explante foliar (Ef) aos 60 dias de indução; F). Presença de idioblasto contendo ráfides (setas) nos embriões somáticos; G). Ilhotas de procâmbio (setas) dispersas pelo meristema fundamental dos embriões somáticos; H). Visão geral de vários primórdios foliares (setas) e presença do domo apical (círculo) em um embrião que está regenerando em plântula. Barra = 100 µm.

reduzido, indiferenciadas, citoplasma denso e núcleos bem desenvolvidos (Fig. 2A). Posteriormente, estas células foram formando estruturas globulares, caracterizando a primeira fase de formação dos embriões somáticos (Figs. 2B-2C-2D). Estes embriões globulares se originavam diretamente da superfície do explante foliar sem nenhuma conexão com o sistema vascular da folha. Nesses embriões, que já se apresentavam formados, observou-se uma estrutura semelhante a um suspensor, unindo o embrião somático em formação, ao tecido de origem (Fig. 2D).

Aos 50 dias de cultivo em meio de indução para a formação de embriões, observou-se que os mesmos apresentavam independência do explante foliar (Fig. 2E), provavelmente iniciando a organização deste embrião, porém não apresentavam ainda uma polaridade distinta. Foi observada também a presença de ráfides (cristais aciculares de oxalato de cálcio ou carbonato de cálcio) encontradas no interior de algumas células dos embriões formados, denominadas idioblastos (Fig. 2F). Além disso, pode-se verificar também a ocorrência de ilhotas de procâmbio dispersas pela extensão do embrião, configurando um arranjo poliárquico (Fig. 2G). Os embriões desenvolvidos apresentavam os meristemas primários (protoderme, meristema fundamental e procâmbio) bem como o surgimento de alguns primórdios foliares (Fig. 2H).

Os embriões maduros apresentavam tecidos mais diferenciados, com primórdios foliares mais desenvolvidos, indicando o processo de regeneração do embrião em plântula (Fig. 2H), além da presença do sistema vascular (xilema e floema) (Fig. 2G). Essas características evidenciam que esses embriões somáticos apresentam capacidade para regenerar plantas completas semelhantes a plantas originadas por embriões zigóticos.

No que se refere às análises histoquímicas não foi detectado a presença de amido nos embriões primariamente formados, reagindo apenas na área do parênquima do explante foliar que corresponde a uma folha adulta (Fig. 3A). Amido foi observado na região do meristema fundamental que circunda o sistema vascular dos embriões em desenvolvimento (Fig. 3B). Em embriões que já se observava primórdios foliares, pode verificar uma boa quantidade de amido em várias regiões da plântula (Fig. 3B).

Quanto às substâncias lipídicas, foram observadas na protoderme do embrião (Figs. 3C-3D), provavelmente cutina, além de pequenas gotículas de lipídeo sob a superfície da cutícula (Fig. 3D). Não foi observado lipídeo no interior do embrião, apenas em seu revestimento.

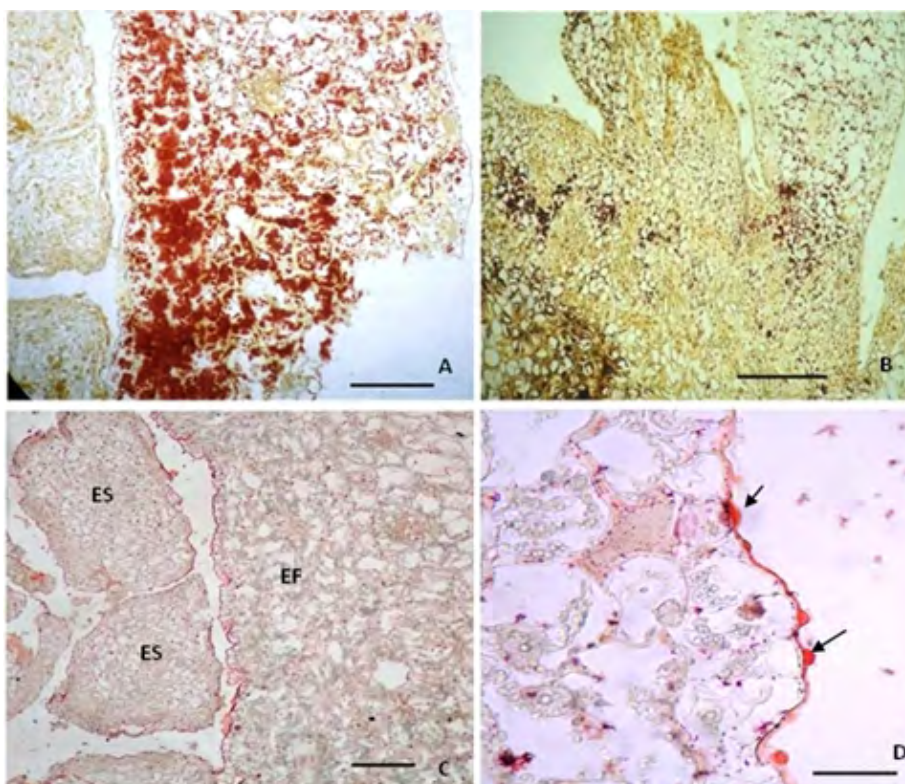


Figura 3. Análises histoquímicas: A). Presença de amido nas células de parênquima do explante foliar e ausência de amido nos embriões somáticos recém-formados Barra= 200 μ m; B). Presença de amido em embriões se desenvolvendo em plântula; C). Presença de lipídeos na superfície dos embriões somáticos mais diferenciados (ES) e no explante foliar (EF); Barra= 100 μ m; D). Detalhe da presença de lipídeos sob a cutícula do embrião (setas) Barra= 30 μ m.

DISCUSSÃO

A oxidação, observada no meio NDM, é considerada um entrave na cultura de tecidos. Esse processo consiste na liberação de compostos fenólicos pelos tecidos, que pode ser uma resposta a vários fatores, como por exemplo, resposta aos ferimentos, altas concentrações de reguladores de crescimento no meio nutritivo ou pela oxidação de polifenóis e quininas, conforme observado por Ledo *et al.*, (2002). A oxidação pode causar toxidez, inibir o crescimento, e, eventualmente, ocasionar a morte do explante (Ozyigit *et al.*, 2007).

As respostas obtidas no meio ½MS acrescido de ANA (0,537µM) e TDZ (13,621µM), gelificado com gelrite e o pH 5,2, aos 25 dias no genótipo estudado, foram similares aos resultados encontrados por Chen e Chang (2006), que trabalhando com o mesmo gênero, com a espécie *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume e com diferentes associações e concentrações entre ANA e TDZ, obtiveram o surgimento dos embriões somáticos aos 20 dias de cultivo na ausência de luz. Porém, neste trabalho só foi observada a presença de embriões apresentando primórdios foliares aos 45 dias. Diferenças relacionadas ao período de obtenção de embriões podem estar associadas ao genótipo, interferindo diretamente na velocidade do processo de indução de embriões somáticos (Torres, 1999).

Neste trabalho, quando os embriões primários e secundários passaram a ser cultivados na presença de luz, apresentaram desenvolvimento progressivo, evoluindo para protocormos e posteriormente plantas. Esse comportamento está associado ao fato da luz promover a regeneração do embrião em plantas, logo fatores como intensidade e qualidade (da luz) alteram as concentrações endógenas de fitoreguladores, espessura dos tecidos e atuam na síntese de pigmentos (Xing *et al.*, 2014).

O sucesso na produção de plantas, a partir de embriões somáticos, depende, por exemplo, do estágio de maturação do embrião e da composição do meio nutritivo (Sharma *et al.*, 1996). Os embriões em estágio avançado de desenvolvimento são praticamente autotróficos e possuem uma menor exigência nutricional (Santos Jesus *et al.*, 2011). A constituição e quantidade dos sais presentes no meio de cultura, o uso de fitoreguladores, fonte de carbono e o tipo de agente gelificante, também podem alterar as propriedades do meio, interferindo na formação de embriões somáticos.

Análise histológica e histoquímica dos embriões somáticos primários e secundários

Ao induzir a rota morfogenética da embriogênese somática em explantes foliares de orquídea, Chen e Chang (2006) observaram comportamento similar ao presente trabalho em *Phalaenopsis amabilis*, ou seja, células meristemáticas em constante divisão sob a superfície do explante, caracterizando o início da formação dos embriões somáticos de forma direta (sem a passagem pela fase de calo), por meio da camada epidérmica do explante. Com o intuito

de restringir a perda de água, estas células epidérmicas não deixam espaços entre elas, sendo perfeitamente justapostas (Alquini *et al.*, 2006). Essas células formaram estruturas globulares que se originavam diretamente da superfície do explante foliar, sem nenhuma conexão com o sistema vascular da folha. Estas características configuram uma particularidade dos embriões somáticos, que é a presença de um sistema vascular fechado, sem conexão vascular com os tecidos do explante inicial (Guerra *et al.*, 1999). Resultados semelhantes foram observados por Carneiro *et al.*, (2014), onde não presenciaram a conexão vascular entre os embriões somáticos, confirmando a individualidade dos embriões formados.

No que diz respeito à estrutura que foi observada semelhante a um suspensor, deve-se considerar que essa é uma estrutura encontrada geralmente em embriões zigóticos, que estabelece grande contato com os tecidos maternos circundantes, provavelmente facilitando o suprimento de nutrientes para o embrião (Capron *et al.*, 2009). Estruturas semelhantes foram encontradas por Ferreira *et al.*, (2005) em *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum., Portillo *et al.*, (2007) em *Agave tequilana* F.A.C. Weber e Carneiro *et al.*, (2014) em *Agave sisalana* Perrine ex Engelm.. De acordo com esses autores, foi possível verificar anatomicamente embriões somáticos ligados ao tecido do explante por um suspensor. Resultados obtidos com embriões somáticos de *Feijoa sellowiana* (O. Berg.) O. Berg (atualmente *Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret) tem demonstrado que existe uma estrutura semelhante a um suspensor que os conectam aos tecidos da planta-mãe (Correia e Canhoto, 2010). A formação, ou não, de uma estrutura semelhante ao suspensor pode estar relacionada a diferentes origens dos embriões somáticos, podendo o mesmo apresentar uma origem unicelular, que geralmente forma um suspensor, ou terem origem multicelular, não formando essa estrutura, sendo apenas provenientes de um grupo de células, que estão ligadas ao tecido da planta-mãe por uma ampla região (Williams e Maheswaran, 1986). No entanto, a formação de um suspensor ou estrutura anexa de embriões somáticos em angiospermas, tem sido bastante questionada devido à insuficiência de estudos mais aprofundados acerca desta estrutura embrionária. Em contrapartida, nas gimnospermas tornou-se um sistema modelo de estudos, como em coníferas (Correia e Canhoto, 2010). Entretanto, George *et al.*, (2008) afirmam que a célula apical passa por sucessivas divisões para originar o embrião, enquanto a célula basal, por meio de divisões anticlinais, formará o suspensor.

Semelhante ao observado neste estudo, Mayer *et al.*, (2008) ao fazer a comparação anatômica das folhas e raízes de *Cymbidium* Sw. (Orchidaceae) cultivadas *ex vitro* e *in vitro*, também constataram a presença de ráfides no meristema fundamental das plantas cultivadas nos dois ambientes, estando em maior número na planta *in vitro*. Esse fato pode estar associado a maior disponibilidade e facilidade de

absorção dos sais presentes no meio nutritivo. Em orquídeas do gênero *Cattleya* Lindl. cultivadas *ex vitro*, também foi observada a ocorrência de idioblastos com ráfides de oxalato de cálcio, por todo o mesofilo (Godoy e Costa, 2003). A presença de cristais de oxalato de cálcio, formados em diferentes órgãos de uma planta, está diretamente associada com a quantidade de cálcio disponível (Zindler-Frank *et al.*, 2001), que pode também estar relacionado com o processo de eliminação do excesso de cálcio (Kostman *et al.*, 2001). Diante do exposto pode-se afirmar que a presença de ráfides nas células do híbrido *Phalaenopsis* Classic Spotted Pink, pode estar atrelado a compartimentalização do excesso de sais no vacúolo celular.

Após a transferência dos embriões para local iluminado, observou-se o desenvolvimento dos tecidos meristemáticos, evoluindo para a formação de tecidos mais diferenciados, como os tecidos primários, como os primórdios foliares. Esse comportamento demonstra a importância da luz na diferenciação dos tecidos e conseqüentemente no desenvolvimento do embrião em planta.

Quanto às análises histoquímicas, a ausência de amido nos embriões provavelmente está associada ao estágio juvenil em que se encontravam, além de serem cultivados na ausência de luz durante o período de indução, ausência de um sistema vascular bem desenvolvido e por ainda não apresentarem um metabolismo fotossintético eficiente. O amido é considerado como o principal carboidrato de reserva nas plantas, atuando como fonte de energia para as alterações metabólicas em plantas ou fornecendo moléculas de açúcares para biossíntese de lipídeos, proteínas, antioxidantes e polissacarídeos (Pescador *et al.*, 2008; Gomez-Gonzalez *et al.*, 2010) e como base de energia para o crescimento, regulação da morfogênese e diferenciação celular das plantas, com grande importância na constituição da estrutura da parede celular (Smeekens, 2000). Análises histoquímicas em jabuticaba-branca (*Myrciaria* sp.) comprovou que o material de reserva de embriões somáticos e zigóticos, era o amido, todavia, os embriões somáticos apresentavam uma quantidade menor dessa reserva comparado com os embriões zigóticos (Motoike *et al.*, 2007).

No que compete às substâncias lipídicas, foi observada a presença de uma cutícula pouco espessa nos embriões, podendo desempenhar um papel de relativa importância contra a perda excessiva de água, o que facilitará a aclimatização dessas plantas, viabilizando a produção de mudas por meio de embriões somáticos primários e secundários no híbrido *Phalaenopsis* Classic Spotted Pink.

CONCLUSÕES

O meio nutritivo MS (Murashige e Skoog, 1962), com a metade da concentração dos sais, acrescido de ANA (0,537µM) e TDZ (13,621µM), gelificado com gelrite e o pH 5,2, proporcionou a formação de embriões somáticos

primários e secundários com competência celular para regenerar plantas, a partir de células epidérmicas dos explantes foliares.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos de forma especial ao Prof. Joaquim Evêncio Neto e a Msc. Maria Edna Gomes de Barros, por possibilitar o uso das dependências do Laboratório de Anatomia Animal da UFRPE para as análises iniciais de histologia.

REFERÊNCIAS

- Alquini Y, Bona C, Boeger, MRT, Costa, CG, Barros, CF. Epiderme. In: Appezzato-da-Glória B, Carmello-Guerreiro SM, editors. Anatomia Vegetal, 2 ed. Viçosa, Brasil: Editora UFV; 2006. p. 87-97.
- Barros F, Vinhos F, Rodrigues VT, Barberena FFVA, Fraga CN, Pessoa EM. Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013 [Access 7 may 2013]. Available at: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179>.
- Batista J N, Bianchetti LB, Pellizzaro K F. Orchidaceae da Reserva Ecológica do Guará. Acta Bot Brasilica. 2005;19(2):221-232. Doi:10.1590/S0102-33062005000200004
- Bukatsch F. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. Mikrokosmos. 1972;61:1-255.
- Carneiro FS, Oliveira SR, Queiroz D, Passos AR, Nascimento MN, Santos KS. Embriogênese somática em *Agave sisalana* Perrine: indução, caracterização anatômica e regeneração. Pesq Agropec Trop. 2014;44(3):294-303. Doi:10.1590/S1983-40632014000300005
- Capron A, Chatfield S, Provart N, Berleth T. Embryogenesis: Pattern Formation from a Single Cell. The Arabidopsis Book /American Society of Plant Biologists. 2009;7: e0126. Doi:10.1199/tab.0126
- Chen JT, Chang WC. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis*. Biol Plant. 2006;50(2):169-173. Doi:10.1007/S10535-006-0002-8
- Correia SM, Canhoto JM. Characterization of somatic embryo attached structures in *Feijoa sellowiana* Berg. (*Myrtaceae*). Protoplasma. 2010;242(1-4):95-107. Doi: 10.1007/s00709-010-0130-z
- Ferreira MGR, Carvalho CHS, Carneiro AA, Damião Filho CF. Indução de embriogênese somática em cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.). Rev Bras Frutic. 2005;27(3):500-503. Doi:10.1590/S0100-29452005000300038
- George EF, Hall MA, Klerk GJ. Somatic Embryogenesis. In: George EF, Hall MA, Klerk, G J De. Plant propagation by tissue culture. 3. ed. Dordrech: Springer, 2008. p. 335-354. Doi:10.1007/978-1-4020-5005-3
- Guerra MP, Torres AC, Teixeira JB. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JA.

- Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI; 1999. p. 533-568.
- Godoy RZ, Costa CG. Anatomia foliar de quatro espécies do gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) do Planalto Central Brasileiro. *Acta Bot Brasilica*. 2003;17(1):101-118. Doi:10.1590/S0102-33062003000100008
- Gomez-Gonzalez S, Ruiz-Jimenez J, Priego-Capote F, De Castro MDL. Qualitative and quantitative sugar profiling in olive fruits, leaves, and stems by gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) after ultrasound-assisted leaching. *J Agric Food Chem*. 2010;58(23):12292-12299. Doi:10.1021/jf102350s
- Ishii Y, Takamura T, Goi M, Tanaka M. Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. *Plant Cell Rep*. 1998;17(6-7):446-450. Doi:10.1007/S002990050423
- Jensen WA. Botanical histochemistry: principles and practice. San Francisco: W.H. Freeman and Company; 1962. p. 408.
- Johansen D A. Plant microtechnique. New York: MacGraw Hill Book; 1940. p. 523.
- Karami O, Deljou A, Kordestani GK. Secondary somatic embryogenesis of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2008;92(3):273-280. Doi:10.1007/s11240-007-9332-2
- Kostman TA, Tarlyn NM, Loewus FA, Franceschi VR. Biosynthesis of L-ascorbic acid and conversion of carbons 1 and 2 of L-ascorbic acid to oxalic acid occurs within individual calcium oxalate crystal idioblasts. *Plant Physiol*. 2001;125(2):634-640. Doi: 10.1104/pp.125.2.634
- Lee LL. Biofábrica de *Phalaenopsis*. In: Lee, TSG, editors. Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro*. São Paulo: Antiqua; 2011. p. 150-175.
- Ledo AS, Lameira AO, Benbadis A. Explantes de cupuaçuzeiro submetidos a diferentes condições de cultura *in vitro*. *Rev Bras Frutic*. 2002;24(3):604-607. Doi:10.1590/S0100-29452002000300005
- Mayer JLS, Ribas LLF, Bona C, Quoirin M. Anatomia comparada das folhas e raízes de *Cymbidium Hort.* (Orchidaceae) cultivadas *ex vitro* e *in vitro*. *Acta Bot Brasilica*. 2008;22(2):323-332. Doi:10.1590/S0102-33062008000200003
- Minamiguchi J, Machado Neto NB. Embriogênese somática direta em folhas de *Phalaenopsis*: Orchidaceae. *Colloquium Agrariae*. 2007;(1):7-13. Doi:10.5747/ca.2007.v03.n1.a22
- Motoike SY, Saraiva ES, Ventrella MC, Silva CV, Salomão LCC. Somatic embryogenesis of *Myrciaria aureana* (Brazilian grape tree). *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2007;89:75-81. Doi:10.1007/s11240-007-9210-y
- Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 1962;15(1):473-497. Doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Ozyigit I, Kahraman IMV, Ercan O. Relation between explant age, total phenols and regeneration response of tissue cultured cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Afr J Biotechnol*. 2007;6(1):3-8. Doi: 10.5897/AJB07.393
- Pearse AGE. Histochemistry: theoretical and applied. *Amer J Med Sci*. 1961;241(1):136.
- Pescador R, Kerbauy GB, Viviani D, Kraus J. Anomalous somatic embryos in *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret (Myrtaceae). *Rev Bras Bot*. 2008;31(1):155-164.
- Portillo L, Santacruz-Ruvalcaba F, Gutiérrez-Mora A, Rodríguez-Garay B. Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar Azul. *In Vitro Cell Dev Pl*. 2007;43(6): 569-575. Doi:10.1007/s11627-007-9046-5
- Quiroz-Figueroa FR, Rojas-Herrera R, Galaz-Avalos RM, Loyola-Vargas VM. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2006;86(3):285-301. Doi:10.1007/s11240-006-9139-6
- Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE. *Biologia Vegetal*. 8th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. p. 856.
- Santos Jesus AM, Villa F, Costa Lara AC, Moacir P. Avaliação do efeito das concentrações de sacarose e dos estádios de desenvolvimento do fruto no cultivo *in vitro* de embriões de frutos de cafeeiro. *Rev Ceres*. 2011;58(6):679-684.
- Sharma DR, Kaur R, Kumar K. Embryo rescue in plants-a review. *Euphytica*. 1996;89(3):325-337. Doi:10.1007/BF00022289
- Sharp WR, Sondahl MR, Caldas LS, Maraffa SB. The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. *Hortic Rev*. 1980;2:268-310.
- Shiraki JN, Diaz EM. Orquídeas. São Paulo: Prefeitura de São Paulo, Secretaria do Verde e do Meio Ambiente. 2012 [Access 7 mar 2015]. Available at: http://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/upload/meio_ambiente/arquivos/publicacoes/curso-orquideas_21-dez.pdf.
- Smeeckens S. Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 2000;51:49-81. Doi:10.1146/annurev.arplant.51.1.49
- Stevens PF. Onwards Angiosperm Phylogeny Website. Available at: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb.2001.01> [Access 22 Dec 2015].
- Torres CA, Caldas LS, Buso JA. Cultura de tecidos e Transformação Genética de Plantas. Brasília: ABCTP/ EMBRAPA, CNPH; 1999. p.517-518.
- Tokuhara K, Mii M. Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by shoot tips of flower stalk buds. *Plant Cell Rep*. 1993;13(1):7-11. Doi:10.1007/BF00232306
- Tsai CC, Huang SC, Huang PL, Chou CH. Phylogeny of the genus *Phalaenopsis* (Orchidaceae) with emphasis on the subgenus *Phalaenopsis* based on the sequences of the internal transcribed spacers 1 and 2 of rDNA. *J Hortic Sci Biotech*. 2003;78(6):879-87.

- Uzelac B, Ninković S, Smigocki A, Budimir S. Origin and development of secondary somatic embryos in transformed embryogenic cultures of *Medicago sativa*. *Biol Plant* 2007;51(1):1-6. Doi:10.1007/s10535-007-0001-4
- Vasic D, Alibert G, Skoric D. Protocols for efficient repetitive and secondary somatic embryogenesis in *Helianthus maximiliani* (Schrader). *Plant Cell Rep.* 2001;20(2):121-125. Doi:10.1007/s002990000291
- Vaz APA, Kerbauy G B. Orchidaceae. In: Terao D, Carvalho ACPP, Barroso TCSF, editors. *Flores tropicais*. Brasília: EMBRAPA; 2005. p. 25-41.
- Williams ES, Maheswaran B. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as embryogenesis group. *Ann Bot.* 1986;57(4):443-462.
- Xing W, Bao Y, Luo P, Bao M, Ning G. An efficient system to produce transgenic plants via cyclic leave-originated secondary somatic embryogenesis in *Rosa rugosa*. *Acta Physiol Plant.* 2014;36(8):2013-2023. Doi:http://dx.doi.org/10.1007/s11738-014-1578-9
- Zindler-Frank E, Honow R, Hesse A. Calcium and oxalate content of the leaves of *Phaseolus vulgaris* at different calcium supply in relation to calcium oxalate crystal formation. *J Plant Physiol.* 2001;158(2):139-144. Doi:10.1078/0176-1617-00045