

## Nota Científica

# Efeito da fonte de carbono na embriogênese somática em *Bactris gasipaes*

Gisela Manuela de França Bettencourt<sup>1</sup>, Laudiane Bruna Zanella<sup>1</sup>, Marguerite Germaine Ghislaine Quoirin<sup>1</sup>, Juliana Degenhardt-Goldbach<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Paraná, Av. Coronel Francisco Heráclito dos Santos, s/n, CEP 81530-900, Curitiba, PR, Brasil

<sup>2</sup>Embrapa Florestas, Estrada da Ribeira, Km 111, C P 319, CEP 83000-000, Colombo, PR, Brasil

\*Autor correspondente:  
[juliana.degenhardt@embrapa.br](mailto:juliana.degenhardt@embrapa.br)

### Termos para indexação:

Camada fina de células  
Glicose  
Sacarose

### Index terms:

Thin cell layer  
Glucose  
Sucrose

### Histórico do artigo:

Recebido em 22/10/2014  
Aprovado em 23/05/2016  
Publicado em 30/06/2016

doi: 10.4336/2016.pfb.36.86.809

**Resumo** - A metodologia de camada fina de células foi utilizada com sucesso para indução de embriogênese somática em região do meristema apical de plantas de pupunha mantidas em casa-de-vegetação. O efeito de três fontes de carbono: sacarose, glicose e manitol na indução de embriogênese somática foi avaliado. Embriões somáticos foram observados após a indução apenas nos meios contendo sacarose ou glicose em igual proporção.

## Effect of carbon source on somatic embryogenesis of *Bactris gasipaes*

**Abstract** - Thin cell layer of meristematic region was successfully used to induce somatic embryogenesis in greenhouse-grown plants of pejobaye. The effects of three sources of carbohydrates, sucrose, glucose and mannitol on induction of somatic embryogenic calli were evaluated. Somatic embryos were observed on media containing either sucrose or glucose.

A pupunha é a única palmeira neotrópica domesticada (Silva & Clement, 2005). Na culinária brasileira, o uso de palmitos extraídos de seu caule vem ganhando cada vez mais destaque e seu fruto é popular em sua área de distribuição natural na Amazônia. Esta espécie apresenta vantagens sobre outras palmeiras muito apreciadas, como *Euterpe edulis*. Ao contrário desta, *Bactris gasipaes* apresenta produção precoce (1,5 ano) e a característica de perfilhar (Villachica, 1996), o que permite sua permanência em campo por até 15 anos.

Um dos principais gargalos de sua exploração é seu sistema de produção. Os plantios comerciais atualmente são implantados a partir de sementes, cuja qualidade e viabilidade normalmente são baixas. A maior parte das sementes são importadas do Peru, em condições inadequadas de transporte e desinfestação. Além

disso, a pupunheira apresenta problemas na produção de sementes nas condições do sul do Brasil, onde a polinização é muitas vezes deficiente. Isso colabora para a formação de cachos com poucos frutos com sementes viáveis (Mora-Urpi, 1984). A produção partenocárpica de frutos vem sendo observada ao longo dos anos, diminuindo ainda mais a produção de sementes e não sendo possível suprir a demanda para a produção de mudas.

A espécie é alógama e a fixação dos ganhos genéticos através da reprodução assexuada é interessante, podendo ser útil em programas de melhoramento da espécie por possibilitar a clonagem de indivíduos superiores. Dentre os métodos de propagação vegetativa, a embriogênese somática vem merecendo destaque na última década e a otimização dos protocolos sugere que sua aplicação

comercial está próxima. Protocolos para embriogênese somática de pupunheira vêm sendo desenvolvidos a partir de diferentes tecidos, como ápices caulinares de plântulas germinadas *in vitro* (Steinmacher et al., 2007c), inflorescências (Steinmacher et al., 2007a) e embriões zigóticos (Steinmacher et al., 2007b). Embora grandes avanços tenham sido obtidos, a otimização dos protocolos ainda é necessária para viabilizar sua aplicação comercial.

Dentre os fatores que influenciam a rota morfogênica da embriogênese somática, a fonte de explante e seu estágio de desenvolvimento são determinantes para a alteração da competência celular (Merkle et al., 1995). O tamanho dos explantes também influencia a capacidade morfogênica (Benkirane et al., 2000; Delporte et al., 2001) e o emprego de explantes obtidos a partir de uma fina camada de células pode romper os domínios de comunicação intercelular existente nos tecidos, facilitando a entrada das células em divisão celular e a desdiferenciação celular. Com esse conceito, foi desenvolvida a técnica denominada TCL (*Thin Cell Layer*), que consiste na utilização de explantes de tamanho reduzido (Van & Lê, 2000). Esta técnica foi utilizada previamente na indução de embriogênese somática em pupunha a partir de plântulas germinadas *in vitro* por Steinmacher et al. (2007c).

Além da influência do explante inicial, o meio de cultura influencia diretamente as respostas embriogênicas dos tecidos responsivos, sendo que a fonte de carbono exerce papel fundamental. A sacarose é normalmente o carboidrato utilizado na embriogênese somática em *B. gasipaes* (Steinmacher et al., 2007a, 2007b, 2007c).

A sacarose é um carboidrato com 12-C. Quando hidrolisado pela sacarose sintase ou invertase, libera uma molécula de glicose e uma de frutose, ambos com 6-C. O manitol, açúcar cujos grupos aldeído e cetona foram reduzidos a álcool, é a forma reduzida da manose e é amplamente distribuído no reino vegetal (Buchanan et al., 2000).

Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da fonte de carbono na formação de embriões somáticos a partir da região do meristema apical de plantas de *Bactris gasipaes* mantidas em casa-de-vegetação.

Foram mantidas 150 plantas de pupunheira com seis meses de idade em vasos na casa-de-vegetação da Embrapa Florestas, Colombo, PR. Em laboratório, as plantas tiveram suas folhas e raízes removidas para exposição dos ápices caulinares.

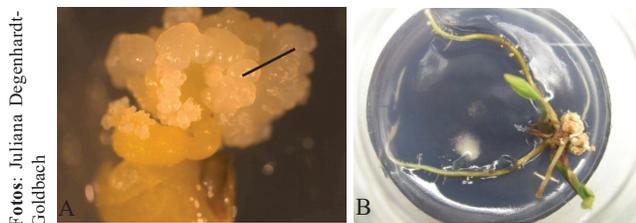
Os ápices caulinares foram mantidos sob água corrente por 3 h, sendo posteriormente esterilizados em capela de fluxo laminar por imersão em solução de 1 g L<sup>-1</sup> de fungicida (princípio ativo: metil tiofanato) por 10 min, seguida de imersão em 70% etanol por 1 min e finalmente 20 min em 5% NaOCl. Após a assepsia, os explantes foram lavados três vezes em água bidestilada autoclavada.

Após a remoção das bainhas foliares, com auxílio de um bisturi, a região do meristema apical foi cortada em cinco segmentos de 0,5 mm – 1 mm (*thin cell layers*), desde a região do meristema apical até 1,5 cm além, no sentido superior. Os segmentos foram então inoculados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com vitaminas de Morel & Wetmore (1951), 300 µM de picloram, 500 mg L<sup>-1</sup> glutamina, 1,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 8 g L<sup>-1</sup> de ágar e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, manitol ou glicose, para avaliar a indução de calos embriogênicos. Os calos não foram subcultivados até apresentarem aparência embriogênica. A maturação e a conversão dos embriões somáticos em plântulas foram realizadas conforme Steinmacher et al. (2007c).

O pH de todos os meios foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, realizada a 121 °C por 15 min. Todas as etapas da cultura foram conduzidas no escuro a 23 ± 2 °C. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições de 4 explantes por tratamentos de diferentes carboidratos. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste t.

O processo de assepsia das plantas mantidas em casa-de-vegetação não foi eficiente, pois vários explantes foram perdidos por contaminação (variando de 28% no meio com glicose a 65% no meio com sacarose), a maioria por fungos, embora bactérias também tenham sido observadas.

Um mês após a indução, calos primários foram observados nos meios contendo sacarose e glicose. Quatro meses depois, foram observados calos com aspecto embriogênico nestes meios, caracterizando um processo indireto de formação de embriões somáticos. Em meio com manitol não foi observada a formação de calos. Após a transferência para meio de maturação, foram observados embriões somáticos (Figura 1).



**Figura 1.** A. Aspecto de calo embriogênico de pupunha contendo embriões somáticos antes de repicagem para o meio de conversão; B. Planta de pupunha obtida por germinação de embrião somático em meio de cultura.

Normalmente, o processo de embriogênese somática consiste de duas etapas principais, a indução do processo e a expressão dos embriões resultantes dele (Jiménez, 2005). Teoricamente, este processo pode ser iniciado a partir de qualquer parte da planta. No entanto, diferenças substanciais na competência são vistas na prática. As células mais competentes para a embriogênese somática são geralmente aquelas vindas de tecidos jovens.

A fonte de carboidrato foi determinante na indução de calos embriogênicos de pupunha. A glicose foi tão eficiente quanto a sacarose na indução, sendo que um mês após a inoculação 60% ( $\pm 34,5$ ) dos explantes saudáveis em meio com sacarose e 58,6% ( $\pm 18,7$ ) dos explantes em meio com glicose haviam iniciado a formação de calos primários. No meio contendo manitol não foi observada a indução de calos.

Os primeiros calos embriogênicos apareceram cinco meses após o início do experimento, quando foram então trocados de meio de cultura pela primeira vez. Os resultados são semelhantes aos observados por Steinmacher et al. (2007c), que obtiveram 43% de calos embriogênicos em meio com sacarose.

A fonte de carboidrato foi testada para outras espécies e embora a maioria dos trabalhos utilize a sacarose, nem sempre este demonstrou ser o melhor carboidrato. Conforme Bensaad et al. (1996), em videira a sacarose produziu a maior formação de calos, seguida pela combinação de sacarose + manitol e de glicose e maltose, para a indução da embriogênese somática a partir de anteras.

No entanto, para esta mesma espécie, a formação de calos foi mais eficiente a partir de tecidos de frutos sem sementes nos meios suplementados com glicose + frutose e sorbitol em comparação com a maltose ou o controle, apenas com sacarose (Yancheva & Roichev, 2005).

Castro et al. (2010), na indução da embriogênese somática em tecidos de laranja doce, concluíram que a glicose não foi eficiente na formação de calos embriogênicos, sendo as melhores fontes de carboidratos a maltose, seguida pela lactose, nas concentrações de 37 e 75 mM. Embriogênese somática não foi observada nos meios de cultura contendo galactose, glicose ou sorbitol para nenhuma cultivar estudada.

Em cacau foi observada a formação de embriões em meios contendo glicose, frutose e sacarose, enquanto que em explantes cultivados continuamente em maltose ou sorbitol não foi observada a produção de embriões somáticos (Traore & Guiltinan, 2006).

O efeito de vários carboidratos também foi testado na indução de embriogênese somática em *Hevea brasiliensis*. A sacarose foi substituída por maltose, frutose ou glicose e a produção de embriões somáticos foi significativamente maior em meio contendo maltose e em tempo menor do que o necessário com sacarose (Blanc et al., 1999).

Para a pupunha, os protocolos de embriogênese somática desenvolvidos utilizam sacarose como fonte de carboidrato (Almeida & Almeida, 2006; Steinmacher et al., 2007a, 2007b, 2007c).

A resposta a determinado carboidrato é dependente da espécie ou mesmo linhagem celular. No entanto, a sacarose é o sacarídeo mais utilizado na cultura de tecidos vegetais e mesmo na embriogênese somática. A determinação da melhor fonte de carboidrato é complexa, uma vez que os açúcares desempenham várias funções durante a embriogênese somática. Nas plantas os açúcares, normalmente, são fonte de carbono e energia, na osmolaridade, tem função na proteção contra estresses e ainda são moléculas sinalizadoras (Lipavská & Konrádová, 2004). Os carboidratos podem ainda agir como agentes morfogênicos, fornecendo informação posicional para a maquinaria celular relacionada ao desenvolvimento (Pien et al., 2001; Rolland et al., 2002). Estudos já demonstraram que a atividade mitótica está relacionada com os gradientes de carboidratos na planta (Borisjuk et al., 1998) e que a atividade da expressão de ciclinas em *Arabidopsis* é regulada por diferentes tipos de açúcares (Riou-Khamlichi et al., 2000), o que pode explicar, em parte, a resposta favorável de um carboidrato em detrimento dos demais na indução de calogênese em tecidos vegetais.

A sacarose é total ou parcialmente hidrolisada em frutose e glicose. O metabolismo da sacarose ocorre intracelularmente e a enzima invertase é responsável por sua hidrólise (George et al., 2008). Apesar da rápida hidrólise, acredita-se que a sacarose tenha efeitos estimulatórios no desenvolvimento de embriões e alguns destes não possam ser substituídos pela glicose e frutose sozinhas, ou suas combinações (Taber et al., 1998; Iraqi & Tremblay, 2001). No entanto, para a pupunha os resultados aqui obtidos demonstraram que a glicose é tão eficiente quanto a sacarose na indução de calos embriogênicos.

O manitol é um açúcar com seis moléculas de carbono e é a forma reduzida da manose 6-fostato, que pode ser convertido em frutose 6-fosfato, outro produto da hidrólise da sacarose. Apesar de ser de lenta absorção, é rapidamente metabolizado pelas plantas e pode estimular respostas fisiológicas e moleculares específicas, por agir como molécula sinalizadora. Este açúcar-álcool é o mais utilizado como agente osmótico para modificar o potencial de água, levando a estresse osmótico e podendo induzir a formação de embriões somáticos (George et al., 2008). No entanto, sua utilização como única fonte de carbono não induziu a formação de calos em pupunha e possivelmente a sua combinação com outro carboidrato, como a sacarose ou a glicose seja necessária para suprir a energia necessária.

Os embriões somáticos obtidos no meio de maturação (Figura 1a) foram transferidos para meio de conversão. Embora a porcentagem de calos com embriões somáticos tenha sido relativamente alta, foram observadas plantas anormais, tanto nos meios com sacarose, quanto com glicose (acima de 30%). Apesar disso, plantas normais também foram obtidas, as quais foram transferidas para meio de multiplicação *in vitro* (Figura 1b).

## Referências

- Almeida, M. & Almeida, C. V. Somatic embryogenesis and *in vitro* plant regeneration from pejobaye adult plant leaf primordia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 9, p. 1449-1452, 2006. DOI: 10.1590/S0100-204X2006000900015.
- Benkirane, H. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration from fragments of immature inflorescences and coleoptiles of durum wheat. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v. 61, n. 2, p. 107-113, 2000. DOI: 10.1023/A:1006464208686.
- Bensaad, Z. M. et al. Effects of cold pretreatment, carbohydrate source and gelling agents on somatic embryogenesis from anthers of *Vitis vinifera* L. cvs. 'Regina' and 'Reichensteiner'. **Acta Horticulturae**, v. 440, p. 504-509, 1996. DOI: 10.17660/ActaHortic.1996.440.88.
- Blanc, G. et al. Effects of carbohydrate addition on the induction of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 59, p. 103-112, 1999. DOI: 10.1023/A:1006437731011.
- Borisjuk, N. et al. Calreticulin expression in plant cells: developmental regulation, tissue specificity and intracellular distribution. **Planta**, v. 206, n. 4, p. 504-514, 1998. DOI: 10.1007/s004250050427.
- Buchanan, B. et al. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Biologists, 2000. 1367 p.
- Castro, L. M. et al. Embriogênese somática a partir de calos de cultivares de laranja doce. **Ciência Rural** v. 40, n. 8, p. 1831-1834, 2010. DOI: 10.1590/S0103-84782010000800026.
- Delporte, F. et al. Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryofragments of wheat. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 67, n. 1, p. 73-80, 2001. DOI: 10.1023/A:1011697316212.
- George, E. F. et al. **Plant propagation by tissue culture: the background**. Dordrecht: Springer, 2008. 504 p.
- Iraqi, D. & Tremblay, F. M. The role of sucrose during maturation of black spruce (*Picea mariana* (Mill.) BSP) and white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss) somatic embryos. **Physiologia Plantarum**, v. 111, p. 381-388, 2001.
- Jiménez, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, v. 47, n. 2-3, p. 91-110, 2005. DOI: 10.1007/s10725-005-3478-x.
- Lipavská, H. & Konrádová, H. Somatic embryogenesis in conifers: the role of carbohydrate metabolism. **In Vitro Cellular & Developmental Biology: Plant**, v. 40, n. 1, p. 23-30, 2004. DOI: 10.1079/IVP2003482.
- Merkle, S. A. et al. Morphogenetic aspects of somatic embryogenesis. In: Thorpe, T. A. (Ed.). **In vitro embryogenesis in plants**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 155-203.
- Mora-Urpí, J. El pejobaye (*Bactris gasipaes* H. B. K.): origem, biología floral y manejo agronómico. In: PALMERAS POCO UTILIZADAS DE AMÉRICA TROPICAL. 1984, Turrialba. **Anais...** Turrialba: FAO/CATIE, 1984. p. 118-160.
- Morel, G. & Wetmore, R. H. Fern callus tissue culture. **American Journal of Botany**, v. 38, n. 2, p. 141-143, 1951.
- Murashige, T. & Skoog, A. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- Pien, S. et al. Novel marker genes for early leaf development indicate spatial regulation of carbohydrate metabolism within the apical meristem. **Plant Journal**, v. 25, n. 6, p. 663-674, 2001.
- Riou-Khamlichi, C. et al. Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression. **Molecular Cellular Biology**, v. 20, n. 13, p. 4513-4521, 2000.
- Rolland, F. et al. Sugar sensing and signaling in plants. **The Plant Cell**, v. 14, p. S185-S205, 2002. DOI: 10.1105/tpc.010455.

- Silva, J. B. F. & Clement, C. R. Wild peijibaye (*Bactris gasipaes* Kunth var. chichagui) in Southeastern Amazonia: pupunha brava (*Bactris gasipaes* Kunth var. chichagui) no sudeste da Amazônia. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19 n. 2 p. 283-286, 2005. DOI: 10.1590/S0102-33062005000200010.
- Steinmacher, D. A. et al. Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 89, n. 1, p. 15-22, 2007a. DOI: 10.1007/s11240-007-9207-6.
- Steinmacher, D. A. et al. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. **In Vitro Cellular & Developmental Biology: Plant**, v. 43, n. 2, p. 124-132, 2007b. DOI: 10.1007/s11627-007-9032-y.
- Steinmacher, D. A. et al. Somatic embryogenesis in peach palm using the thin cell layer technique: induction, morpho-histological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation. **Annals of Botany**, v. 100, p. 699-709, 2007c. DOI: 10.1093/aob/mcm153.
- Taber, R. P. et al. Kinetics of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) somatic embryo development. **Canadian Journal of Botany**, v. 76, p. 863-871, 1998. DOI: 10.1139/b98-050.
- Traore, A. & Guiltinan, M. J. Effects of carbon source and explant type on somatic embryogenesis of four cacao genotypes. **HortScience**, v. 41, n. 3, p. 753-758, 2006.
- Van, K. T. T. & Lê, B. V. Current status of thin cell layer method for the induction of organogenesis or somatic embryogenesis in woody trees. In: Jain, S. M. et al. (Ed.). **Somatic embryogenesis in woody plants**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. v. 6. p. 51-92.
- Villachica L., H. **Cultivo del pijuayo (*Bactris gasipaes* Kunth) para palmito en la Amazonia**. Lima: Tratado de Cooperacion Amazonica, 1996. 153 p.
- Yancheva, S. D. & Roichev, V. Carbohydrate source can influence the efficiency of somatic embryogenesis in seedless grapes (*Vitis vinifera* L.). **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 19, n. 2, p. 62-66, 2005. DOI: 10.1080/13102818.2005.10817192.

