

INTERAÇÃO ENTRE SACAROSE E ÁCIDO ABCSÍCICO NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE CAULÍCULOS DE *Euterpe edulis*

Mariana Ribeiro de Almeida¹, Tamyris de Mello², Taísa de Fátima Rodrigues de Almeida¹, José Carlos Lopes¹, Rodrigo Sobreira Alexandre²

¹Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Alto Universitário, S/Nº, Guararema, 29500-000, Alegre - ES, Brasil, mariribeiro11@hotmail.com, aalmeida049@gmail.com, jcufes@bol.com.br

²Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Avenida Governador Lindemberg, 316, Centro, 29550-000, Jerônimo Monteiro - ES, Brasil, tamyrisdemello@gmail.com, rodrigossobreiraalexandre@gmail.com

Resumo

Objetivou-se com este trabalho, investigar a utilização de diferentes concentrações de sacarose, combinada ou não com o ácido abscísico (ABA) durante a maturação de embriões somáticos de *E. edulis*. Foram utilizados como fonte de explantes plântulas de *E. edulis* germinadas *in vitro*, com seis meses de idade, essas plantas foram excisadas, de modo que foram utilizados os segmentos de caulículos para a embriogênese somática. A indução foi realizada com meio de cultura MS basal, suplementado com picloram (150 µM), após 60 dias, os calos foram transferidos para meio MS com diferentes concentrações de sacarose (0, 1, 3, 6%) e/ou suplementado com ABA (5 µM). Após 90 dias de cultivo, observou-se que os tratamentos que continham sacarose, foram menos acometidos pela oxidação. Os tratamentos Sac 6% e Sac 3% + ABA tiveram maior número de embriões no total, não diferindo entre si, estatisticamente. Portanto, a utilização da sacarose a 6%, dentre os tratamentos testados, é a mais adequada para a etapa de maturação de embriões somáticos advindos de explantes de segmentos de caulículo de *E. edulis* devido a maior formação de embriões somáticos.

Palavras-chave: Cultivo *in vitro*. Juçara. Propagação de plantas.

Área do Conhecimento: Engenharia Agrônoma - Engenharia Florestal.

Introdução

A embriogênese somática é uma técnica da cultura de tecidos vegetais, que pode ser uma ferramenta chave para ser utilizada em plantas com dificuldade de propagação. Embriogênese somática, a partir de células somáticas, ou seja, sem haver a fusão de gametas, que destina-se ao final na regeneração de plântulas somáticas (Gomes *et al.*, 2006). Baseia-se na totipotencialidade, a qual, possibilita que células vegetais diferenciadas revertam para um estágio de desenvolvimento anterior, em um processo denominado de desdiferenciação (Fehér, 2015).

A propagação da espécie *Euterpe edulis* seria bastante beneficiada ao utilizar esse método de propagação *in vitro*, a considerar algumas dificuldades enfrentadas por esta espécie, como a recalcitrância de suas sementes (Panza; Laínez; Maldonado, 2004), germinação lenta e desuniforme (Cursi; Cicero, 2014) e elevada taxa de mortalidade de suas mudas (Fantini; Guries, 2007). Aliado a esses fatores, está classificada como vulnerável a extinção (Mma, 2022) devido a intensa exploração do palmito, pois ao retirá-lo a palmeira morre, já que a sua estipe é única e não perfilha.

E. edulis é pertencente à família Arecaceae, e possui ampla distribuição por toda Floresta Atlântica. Apresenta grande potencial comercial pelo consumo de seus frutos devido a sua propriedade química, sendo um excelente antioxidante, devido a presença de pigmentos antocianínicos (Crozatti *et al.*, 2023). O consumo pode ser feito através de sua polpa que é indicada como promissora no tratamento da redução da inflamação e controlando os níveis de glicemia (Cardoso *et al.*, 2018).

Diante a importância dessa espécie e a necessidade de se estabelecer formas de propagação diferentes da convencional, objetivou-se com este trabalho investigar diversas concentrações de

sacarose, combinada ou não com o ácido abscísico (ABA) durante a maturação da embriogênese somática de *E. edulis*.

Metodologia

Os frutos imaturos, aproximadamente 180 dias após a antese, de *E. edulis* foram colhidos em uma planta matriz localizada em Pedra Menina, situada na divisa dos municípios de Espera Feliz - MG e Dolores do Rio Preto - ES, próximo ao Parque Nacional do Caparaó – Brasil, com coordenadas 20°32'45,4" S, 41°49'35,7" W e altitude de 951 m. Esses frutos, depois de colhidos, foram acondicionados em caixa térmica durante o transporte para o Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV), localizado no Centro de Ciências Agrárias e Engenharias (CCAEE) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), no município de Jerônimo Monteiro - ES, onde o experimento foi conduzido. No LCTV, o material vegetal foi previamente lavado com água, detergente neutro e hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl) (QBoa®) por 10 min e em seguida foi retirado o tegumento. Após esse processo, as sementes desprovidas de tegumento foram imersas em uma solução de ácido ascórbico 2% (Dinâmica®) para evitar oxidação.

Na câmara de fluxo laminar foi realizado a desinfestação desse material, com a sua imersão em álcool etílico 70% por 1 min, em seguida no hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl) (QBoa®) por 10 min, com a finalização desse tempo, foi feita a tríplex lavagem em água destilada e autoclavada e por fim, a imersão em uma solução de amoxicilina 3 g L⁻¹ (Germed®) por 10 min seguidamente de uma nova tríplex lavagem.

Posteriormente, as sementes foram estabelecidas em tubos de ensaios contendo cada um 10 mL de meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962) (Sigma-Aldrich®) com vitaminas Gamborg (Sigma®) acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose (Dinâmica®), 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol (Sigma-Aldrich®), 5,5 g L⁻¹ de ágar (Kasvi®), com pH ajustado a 5,7 ± 0,1 com a adição de hidróxido de potássio (KOH) 0,1 M e/ou ácido clorídrico (HCl) 1 M. Os tubos de ensaio foram vedados com plástico filme e mantidos em sala de crescimento no escuro a 27 ± 2 °C por 180 dias, de acordo com o proposto por Mello *et al.* (2024).

Dado o período de tempo, as plântulas com seis meses de idade foram seccionadas e utilizados os segmentos de caulículos como fonte de explante para a embriogênese somática, para isso, com auxílio de um bisturi, foram realizados cortes verticais de aproximadamente 1 cm, e cada segmento foi seccionado longitudinalmente ao meio. Durante a indução embriogênica, esses explantes foram dispostos com o ferimento longitudinal voltado para cima em placas de petri (90 x 15 mm) contendo 20 mL de meio MS basal (Sigma-Aldrich®), após autoclavagem, foi suplementado com 150 µM de picloram (Sigma®) filtrado (Mello *et al.*, 2023; 2024). Os explantes foram mantidos em sala de crescimento a 27 ± 2 °C no escuro, por 60 dias.

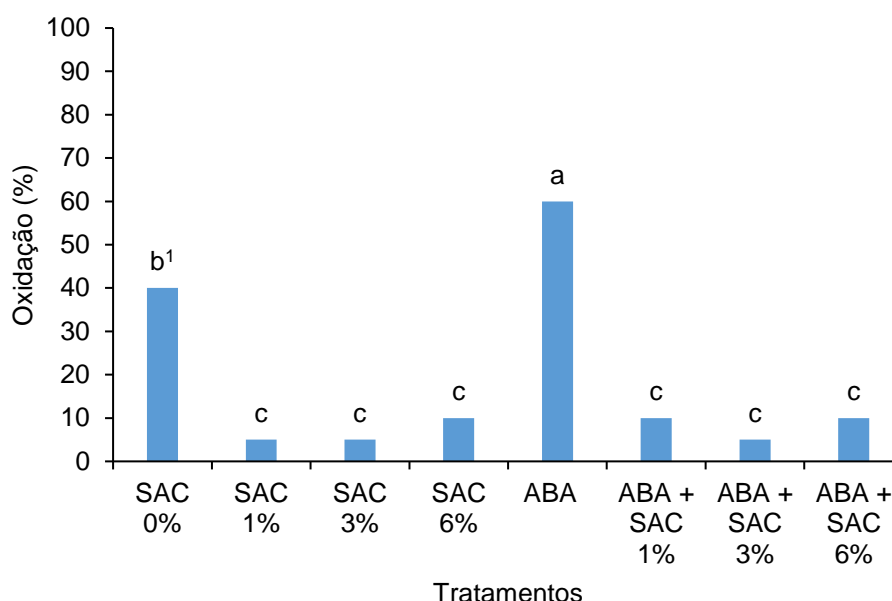
Finalizado o tempo da indução, os calos obtidos na indução foram transferidos para o meio de maturação, o qual consistiu em um meio MS basal com diferentes concentrações de sacarose (0, 1, 3, 6%) e/ou suplementado com ácido abscísico (ABA) (5 µM). Durante a fase de maturação, os calos foram mantidos em sala de crescimento a 27 ± 2 °C no escuro, por 90 dias. Ao final, foi analisado a oxidação (%) e número de embriões (NE), sendo discriminado em embriões globulares, escutulares e coleoptilares.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com oito tratamentos, sendo compostos por diferentes concentrações de sacarose (0, 1, 3, 6%) e ausência ou presença de ABA (5 µM). Cada tratamento foi composto de cinco repetições com quatro segmentos de caulículo. Os dados foram submetidos a análise de variância, e teste de Tukey ($p < 0,05$), com auxílio do software R (R CORE TEAM, 2024).

Resultados

Após 90 dias de maturação, os calos provenientes dos tratamentos com sacarose exibiram menor oxidação não diferindo entre si estatisticamente (Figura 1).

Figura 1: Oxidação após 90 dias de maturação de calos de segmento de caulículos de *E. edulis*

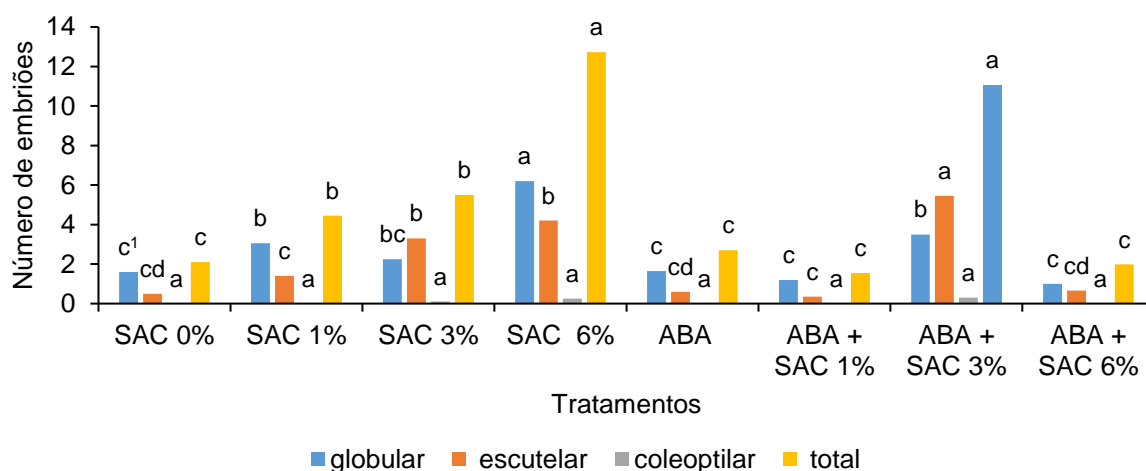


Fonte: o autor.

¹Médias com letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

Em relação ao número total de embriões formados tem-se que a Sac 6% e ABA + Sac 3% foram mais eficazes com 12,73 e 11,04 embriões, respectivamente, sendo ambos estatisticamente superiores aos demais. Além disso, ao analisar a maturação desses embriões observa-se que os tratamentos não distinguiram entre si em relação ao número de embriões coleoptilares (Figura 2).

Figura 2: Número de embriões após 90 dias de maturação de segmentos de caulículos de *E. edulis*



Fonte: o autor.

¹Médias com letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

Discussão

A oxidação é um grande problema encontrado na cultura de tecidos vegetais, devido a presença de compostos fenólicos, o que gera o escurecimento dos tecidos e posterior morte dos mesmos (Jones; Saxena, 2013). No presente trabalho, a exclusão do ABA não teve impacto quanto a oxidação dos calos, porém quando não há a presença de sacarose no meio de cultura, os calos apresentam alta oxidação (Figura 1). Isso se deve pelo fato da sacarose, no meio de cultura, está relacionada com a manutenção do potencial osmótico e também com a conservação das células (Galdiano Júnior *et al.*, 2013).

Observa-se nesse caso, que não há necessidade da suplementação do meio com ABA, pois apenas a utilização de sacarose a 6% foi o suficiente para gerar embriões somáticos. Embora, seja necessário um ajuste no protocolo, pois os embriões somáticos globular estão sendo formados, porém não há a sua diferenciação em escutelar e coleoptilar (Figura 2).

Conclusão

Para diminuir a oxidação dos calos, recomenda-se a utilização de sacarose no meio de maturação. A sacarose a 6% foi o tratamento mais eficaz na maturação de calos de *E. edulis*, advindos de explantes de segmentos de caulículo.

Referências

- CARDOSO, A. L.; LIZ, S.; RIEGER, D. K.; FARAH, A. C. A.; VIEIRA, F. G. K.; ASSIS, M. A. A.; DI PIETRO, P. F. An update on the biological activities of *Euterpe edulis* (Juçara). **Planta Medica**, v. 84, n. 8, p. 487-499, 2018.
- CROZATTI, T. T. S.; MANGOLIM, C. S.; LARENTIS, P. V.; MELLO, J. C. P. microencapsulation, and application of anthocyanins from juçara palm fruit (*Euterpe edulis* Mart.): enhancement of natural pigment. **Journal of Food Science and Technology**, v. 60, p. 361-371, 2023.
- CURSI, P. R.; CICERO, S. M. Fruit processing and the physiological quality of *Euterpe edulis* Martius seeds. **Journal of Seed Science**, v. 36, n. 2, p.134-142, 2014.
- FANTINI, A. C.; GURIES, R. P. Forest structure and productivity of palmitero (*Euterpe edulis* Martius) in the Brazilian Mata Atlântica. **Forest Ecology and Management**, v. 242, p. 185-194, 2007.
- FEHÉR, A. Somatic embryogenesis—stress-induced remodeling of plant cell fate. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1849, p. 385-402, 2015.
- GALDIANO JÚNIOR, R. F.; MANTOVANI, C.; FARIA, R. T.; LEMOS, E. G. M. Concentrações de sacarose no desenvolvimento *in vitro* e na aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 2, p. 583–592, 2013.
- GOMES, F. L. A. F.; HEREDIA, F. F.; SILVA, P. B.; FACÓ, O.; CAMPOS, F. A. P. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (*Cactaceae*). **Scientia Horticulturae**, v. 108, n. 1, p. 15-21, 2006.
- JONES, A. M. P.; SAXENA, P. K. Inibição da biossíntese de fenilpropanóides em *Artemisia annua* L.: Uma nova abordagem para reduzir o escurecimento oxidativo em cultura de tecidos vegetais. **PLoS One**, v. 8, n. 10, 2013.
- MELLO, T.; CORREIA, L. N. F.; HEGEDUS, C. E. N.; SCHMILDT, E. R.; FERREIRA, A.; LOPES, J. C.; OTONI, W. C.; ALEXANDRE, R. S. Cell reprogramming via direct

somatic embryogenesis in an Atlantic Forest species vulnerable to extinction: *Euterpe edulis* stem segments induced with picloram. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 154, p. 131-140, 2023.

MELLO, T.; SILVA, T. D.; ZANARDO, T. É. C.; ALMEIDA, F. A. N.; OLIVEIRA, L. B.; HEGEDUS, C. E. N.; ANJOS, B. B.; SCHMILDT, E. R.; FERREIRA, A.; FERREIRA, M. F. S.; LOPES, J. C.; VIEGAS, G. M. F.; OTONI, W. C.; ALEXANDRE, R. S. Somatic embryogenesis in *Euterpe edulis* Martius is improved by wounding, explant orientation, and suspension culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 156, n. 31, 2024.

MELLO, T.; ZANARDO, T. E. C.; SILVA, T. D.; COSTA, J. S.; FAGUNDES, D. P.; ARAUJO, C. P.; ANJOS, B. B.; SCHMILDT, E. R.; FERREIRA, A.; FERREIRA, M. F.; LOPES, J. C.; OTONI, W. C.; ALEXANDRE, R. S. Chronological age, changes in DNA methylation, and endogenous hormone levels of explants promote somatic embryogenesis of *Euterpe edulis* Martius. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 157, n. 38, 2024.

MMA. Ministério do meio ambiente – MMA. 2022. Disponível em: https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/2020/P_mma_148_2022_altera_anexos_P_mma_443_444_445_2014_atualiza_especies_ameacadas_extincao.pdf.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-479, 1962.

PANZA, V.; LAÍNEZ, V.; MALDONADO, S. Seed structure and histochemistry in the palm *Euterpe edulis*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 145, p. 445-453, 2004.

R CORE TEAM. **R**: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. R version 4.2.2. 2024.

Agradecimentos

Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo – FAPES, pelo auxílio financeiro, concedendo a Bolsa de mestrado PROCAP - MESTRADO EDITAL FAPES Nº 11/2021.