

Efeito do frio sobre os carboidratos solúveis em culturas embriogênicas de *Acca sellowiana* O. Berg (Myrtaceae)

LIANA H. G. MENGARDA¹, ROSETE PESCADOR¹, EDISON P. CHU² e RITA DE CÁSSIA L. FIGUEIREDO-RIBEIRO^{2,3}

(recebido: 14 de agosto de 2008; aceito: 05 de março de 2009)

ABSTRACT – (Effect of cold on soluble carbohydrates of embryogenic cultures of *Acca sellowiana* O. Berg (Myrtaceae)). The pathway of somatic embryogenesis in *Acca sellowiana*, a fruit tree species with limitations concerning vegetative propagation, was well established but the number of embryos that restart growth after the cotyledonary phase is low. In this work, somatic embryos at different developmental stages obtained after treatments with 2,4-D were submitted to cold (4 °C) during 20 days to induce transformation of embryos into plantlets. High proportion (95%) of somatic embryogenesis was found from zygotic embryos treated with 2,4-D continuously (T1) when compared to transitory treatment with 2,4-D (T2 – 55%). However, T1 induced higher rates (82%) of deformation than T2 (62%). In both treatments, no plantlets were obtained from somatic embryos after cold. In T1, 50% of the embryos cultivated at the globular phase remained quiescent and only embryos at the cotyledonary phase (76%) showed positive responses indicating restart of growth. In T2, only 30% of embryos at cotyledonary phase turned greenish, and presented higher values of total sugars. The carbohydrate analyses showed *myo*-inositol, glucose, fructose and sucrose as the major components, present in different proportions, the latter decreasing during the culture period. The low levels of raffinose during the growth period and their reduction under cold treatment could be related to changes of the normal somatic embryo development, without accumulation of carbohydrates, thus inhibiting plantlet regeneration.

Key words - *Acca sellowiana*, raffinose, soluble carbohydrates, somatic embryogenesis

RESUMO – (Efeito do frio sobre os carboidratos solúveis em culturas embriogênicas de *Acca sellowiana* O. Berg, (Myrtaceae)). A rota da embriogênese somática de *Acca sellowiana*, uma espécie arbórea frutífera com limitações quanto à propagação vegetativa, já foi estabelecida mas o número de embriões que restabelecem o crescimento após a fase cotiledonar é baixo. No presente trabalho, embriões somáticos em diferentes fases de desenvolvimento foram obtidos após tratamentos com 2,4-D e submetidos à condição de frio (4 °C) durante 20 dias, visando induzir a transformação de embriões somáticos em plântulas. Observou-se que 95% dos embriões zigóticos desenvolveram embriões somáticos quando tratados com 2,4-D de forma contínua (T1), enquanto que apenas 55% foram formados quando a auxina foi usada na forma pulsada (T2). Porém, o tratamento T1 induziu altas taxas (82%) de deformações nos embriões quando comparados a T2 (62%). Em ambos os tratamentos, não houve formação de plântulas a partir de embriões somáticos após a exposição ao frio, sendo observada redução nos níveis de rafinose. Em T1, 50% dos embriões cultivados na fase globular permaneceram quiescentes e apenas os embriões na fase cotiledonar (76%) apresentaram características positivas de retomada de desenvolvimento, havendo, porém, redução nos teores de açúcares totais com o desenvolvimento e a diferenciação dos embriões. No tratamento T2, apenas 30% dos embriões na fase cotiledonar tornaram-se verdes e apresentaram maiores valores de carboidratos solúveis totais. A análise da composição destes açúcares evidenciou que os componentes majoritários foram *myo*-inositol, glucose e frutose, no início da cultura e teores decrescentes de sacarose durante o período de cultivo. As baixas concentrações de rafinose durante o período de crescimento e sua redução durante o tratamento a frio, bem como o complexo metabolismo dos carboidratos associado ao uso de reguladores de crescimento podem estar relacionadas com as alterações observadas no desenvolvimento normal dos embriões somáticos, sem haver acúmulo de carboidratos, e inibindo a regeneração das plântulas de *Acca sellowiana*.

Palavras-chave - *Acca sellowiana*, carboidratos solúveis, embriogênese somática, rafinose

Introdução

A embriogênese somática é um processo complexo e seu sucesso depende do controle de grande número de variáveis, uma vez que cada espécie apresenta características

únicas, determinadas por fatores genéticos, pelo estado fisiológico da planta matriz e pelo efeito do meio sobre fatores endógenos (Jiménez 2005). Dentre os reguladores de crescimento, o mais utilizado para indução da embriogênese somática é o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), que aparentemente promove um gradiente de distribuição de auxinas *in vivo*, possivelmente através do estímulo de proteases de repressores de transcrição desse regulador, e conseqüente sinalização entre as células (Jiménez 2005). Dessa forma, é estabelecido um

1. Universidade Regional de Blumenau, CCEN, Rua Antônio da Veiga 140, Caixa Postal 1407, 89012-900 Blumenau, SC, Brasil.
2. Instituto de Botânica de São Paulo, Caixa Postal 3005, 01061-970 São Paulo, SP, Brasil.
3. Autor para correspondência: ritarib@usp.br

gradiente no eixo ápice-base (caule-raiz), prosseguindo o desenvolvimento com as demais fases da embriogênese somática (Jenik & Barton 2005).

O acúmulo adequado de reservas como carboidratos solúveis, amido e proteínas afeta de forma especial a embriogênese somática, sendo crucial para a retomada do desenvolvimento após a obtenção de embriões cotiledonares (Attree *et al.* 1992, Flinn *et al.* 1993, Chanprame *et al.* 1998). Devido às múltiplas funções que os açúcares desempenham nas células, incluindo transporte, fornecimento de energia e de esqueletos carbônicos e regulação do potencial osmótico e da expressão gênica, o metabolismo dos carboidratos solúveis representa um dos mais importantes processos no ciclo celular (Carrier *et al.* 1999). Em particular, esses compostos parecem agir na proteção das células embrionárias durante a dessecação, substituindo a água na manutenção de estruturas hidrofílicas, evitando a formação de cristais intra- e intercelulares (Hoekstra & Golovina 1999). Eles também são importantes na formação do embrião, atuando como sinalizadores do processo morfogênico (Verma *et al.* 1977, Lou *et al.* 1996).

A goiabeira serrana (*Acca sellowiana* O. Berg) é uma espécie nativa frutífera do Sul do Brasil, à qual são atribuídas limitações diversas, tanto na propagação vegetativa convencional, quanto na micropropagação organogênica (Canhoto & Cruz 1996). A rota da embriogênese somática desta espécie foi inicialmente estabelecida por Cruz *et al.* (1990) e o efeito da composição de açúcares do meio (Canhoto & Cruz 1994), de fatores hormonais (Guerra *et al.* 2001), da influência do genótipo (Guerra *et al.* 1997) e uma análise histoquímica minuciosa (Cangahuala-Inocente *et al.* 2004), bem como a descrição de anomalias nos embriões somáticos (Pescador *et al.* 2008a) já foram relatadas. Contudo, os processos fisiológicos da rota completa da embriogênese nessa espécie ainda não são suficientemente conhecidos, de forma a permitir o sucesso na obtenção de plântulas normais a partir da embriogênese somática. De acordo com Pescador *et al.* (2008a), o número de embriões somáticos de *A. sellowiana* que retomam o desenvolvimento após a fase cotiledonar é muito baixo.

O uso de temperaturas baixas para a indução e estímulo do crescimento de embriões somáticos vem sendo considerado como uma alternativa para o processo natural de dessecação e subsequente retomada do desenvolvimento desses embriões (Konrádová *et al.* 2003). Pond *et al.* (2002), por exemplo, observaram aumento na tolerância à dessecação e desenvolvimento mais vigoroso de embriões somáticos de *Picea glauca* (Moench) Voss quando submetidos ao frio antes da fase

de dessecação. De acordo com Konrádová *et al.* (2003), o acúmulo de oligossacarídeos da série da rafinose (RFOs), induzido por tratamento a 4 °C, é um fator essencial para a tolerância de embriões somáticos de *Picea abies* (L.) H. Karst ao estresse e consequente sucesso na germinação.

No presente trabalho estão descritos aspectos morfológicos dos embriões somáticos de *Acca sellowiana* em diferentes fases do desenvolvimento, após serem submetidos a temperaturas baixas associadas a dois tratamentos com 2,4-D. A análise de açúcares endógenos nesses embriões também foi realizada com vistas a contribuir para melhor compreensão do processo de manutenção da viabilidade dos embriões somáticos dessa espécie, nas fases tardias do desenvolvimento.

Material e métodos

Embriões zigóticos obtidos de sementes em maturidade fisiológica (aproximadamente 120 dias após antese – DAA) foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura de indução LPm (Von Arnold & Eriksson 1981), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, glutamina 4 μM, 7 g L⁻¹ de ágar e 5 mg L⁻¹ de 2,4-D (pH 5,7) e esterilizado em autoclave por 20 min, constituindo os seguintes tratamentos: T0 = controle, isento de auxina; T1 = meio LPm com 5 mg L⁻¹ de ácido 2,4-dicloroacético (2,4-D), de forma contínua durante 65 dias de cultura; e T2 = meio LPm com 5 mg L⁻¹ de 2,4-D durante os primeiros 15 dias de cultura (“pulso de auxina”), seguindo por cultura em meio desprovido de 2,4-D até o final do período. Para cada tratamento as culturas foram estabelecidas a partir de 400 explantes (embriões zigóticos). As culturas foram mantidas no escuro, em câmaras de crescimento a 25 ± 2 °C, sendo avaliadas quanto à morfologia e amostradas a cada cinco dias para as análises bioquímicas, após congelamento em nitrogênio líquido e armazenamento a -20 ± 2 °C.

Aos 50 dias de cultura, nos tratamentos em que houve formação de calos e de embriões somáticos em diferentes fases de desenvolvimento (globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar), as culturas foram transferidas para câmaras de crescimento a 4 ± 2 °C, sendo coletadas amostras para análises bioquímicas aos 5, 10 e 15 dias de tratamento a frio, totalizando 65 dias de cultura. Após esse período todos os embriões formados foram avaliados novamente quanto à morfologia, sendo calculada a porcentagem de embriões normais ou tipo de deformação apresentada. A seguir, cerca de 25 embriões somáticos em cada uma das fases de desenvolvimento, para cada um dos tratamentos (T1, T2 e controle) foram cultivados em meio LPm, permanecendo em câmaras de crescimento com fotoperíodo de 16 h de luz (50 μmol m⁻² s⁻¹) por mais 20 dias. A seguir os embriões foram avaliados quanto à retomada do desenvolvimento, sendo determinado o número de embriões nas fases globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar.

Para a análise de carboidratos, amostras contendo cerca de 1 g de massa fresca foram submetidas à extração tripla em etanol 80% (a 80 °C por 5 min), seguida de centrifugação a 3.000 g, a 20 °C por 10 min e filtração em microfibras de vidro (retenção de partículas com 2,7 µm – pré-filtro de fibra de vidro, da Merck). Da combinação dos três extratos alcoólicos foi obtida a fração correspondente aos açúcares solúveis. A quantificação de carboidrato total foi feita por análise colorimétrica pelo método do fenol-sulfúrico (Dubois *et al.* 1956), utilizando D-glucose (Sigma) como padrão, sendo expresso em mg g⁻¹ de massa fresca (MF).

Para análise da composição dos açúcares solúveis, amostras de cada tratamento, cada uma equivalente a 400 µg de carboidrato total foram concentradas até a secura em evaporador rotatório a 35 °C. A seguir, foram retomadas em 500 µL de água (tipo I) e purificadas em colunas de troca iônica (resina catiônica 50×8-200 Na⁺ e resina aniônica 1×8-200 Cl⁻). Após aferição do volume, as amostras foram submetidas à análise por HPAEC/PAD em cromatógrafo Dionex mod. DX-300 (USA), com gradiente de hidróxido de sódio de 24 a 200 mM à temperatura ambiente, com fluxo do eluente de 1,0 ml min⁻¹, isocrático de 24 mM por 10 min, seguido do gradiente por 20 min. Os potenciais aplicados ao PAD em E1 (540 ms), em E2 (100 ms) e em E3 (50 ms) foram 0,05, 0,60 e -0,60 V, respectivamente, com nível de sensibilização de 1000 nA. Os açúcares solúveis presentes nas amostras foram comparados com padrões externos adquiridos da Sigma (USA).

Resultados e discussão

Formação e desenvolvimento dos embriões somáticos – O 2,4-D é o principal regulador de crescimento usado para induzir a formação de embriões somáticos em sistemas *in vitro*, atuando sobre as células dos embriões zigóticos e alterando a competência das mesmas (Jiménez 2005). Resultados prévios mostraram que o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de *Acca sellowiana* tratados com 2,4-D de forma contínua ou transitória induzia a formação e o desenvolvimento de embriões somáticos, enquanto que na ausência desse regulador ocorria apenas a germinação das sementes e o crescimento inicial das plântulas (Guerra *et al.* 1997). A importância dessa auxina na indução da embriogênese somática de *A. sellowiana* foi posteriormente confirmada por Guerra *et al.* (2001).

No presente trabalho, observamos maior porcentagem de embriões somáticos formados a partir dos embriões zigóticos tratados com 5 mg L⁻¹ de 2,4-D na forma contínua, com 95% de culturas embriogênicas ao final do período, enquanto que no tratamento com 2,4-D aplicado de forma pulsada, houve 55% de embriões. Estes resultados indicaram que os explantes zigóticos de *A. sellowiana* eram adequados para a formação de

embriões somáticos quando tratados com 2,4-D nessas condições, reforçando as informações prévias de Guerra *et al.* (1997). Contudo, nos dois casos, a maior porcentagem encontrada foi de embriões em fase globular, mesmo após 65 dias de cultura (figura 1). Tais resultados sugerem que a indução e o desenvolvimento embrionário, em diferentes grupos de células, podem ter ocorrido em momentos distintos, dependendo provavelmente da célula inicial ou do conjunto de células-alvo que estavam em contato com o meio de cultura, apresentando, assim, desenvolvimento não sincronizado dos embriões. Por conta disto, a exposição ao 2,4-D na faixa utilizada pode ter favorecido a manutenção de um ciclo celular repetitivo (Gupta *et al.* 1993), levando à maior porcentagem de embriões nos estágios iniciais de desenvolvimento, como já observado por Guerra *et al.* (1999).

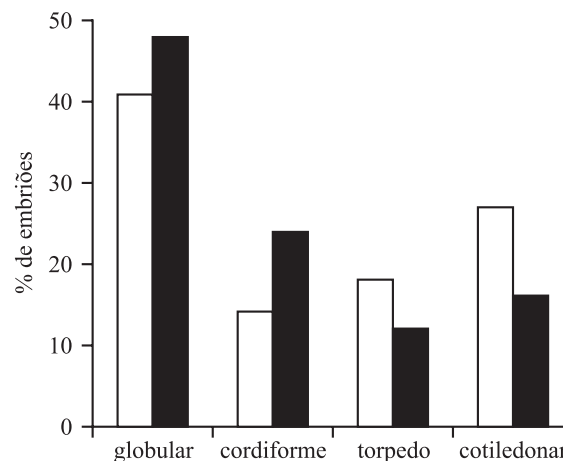
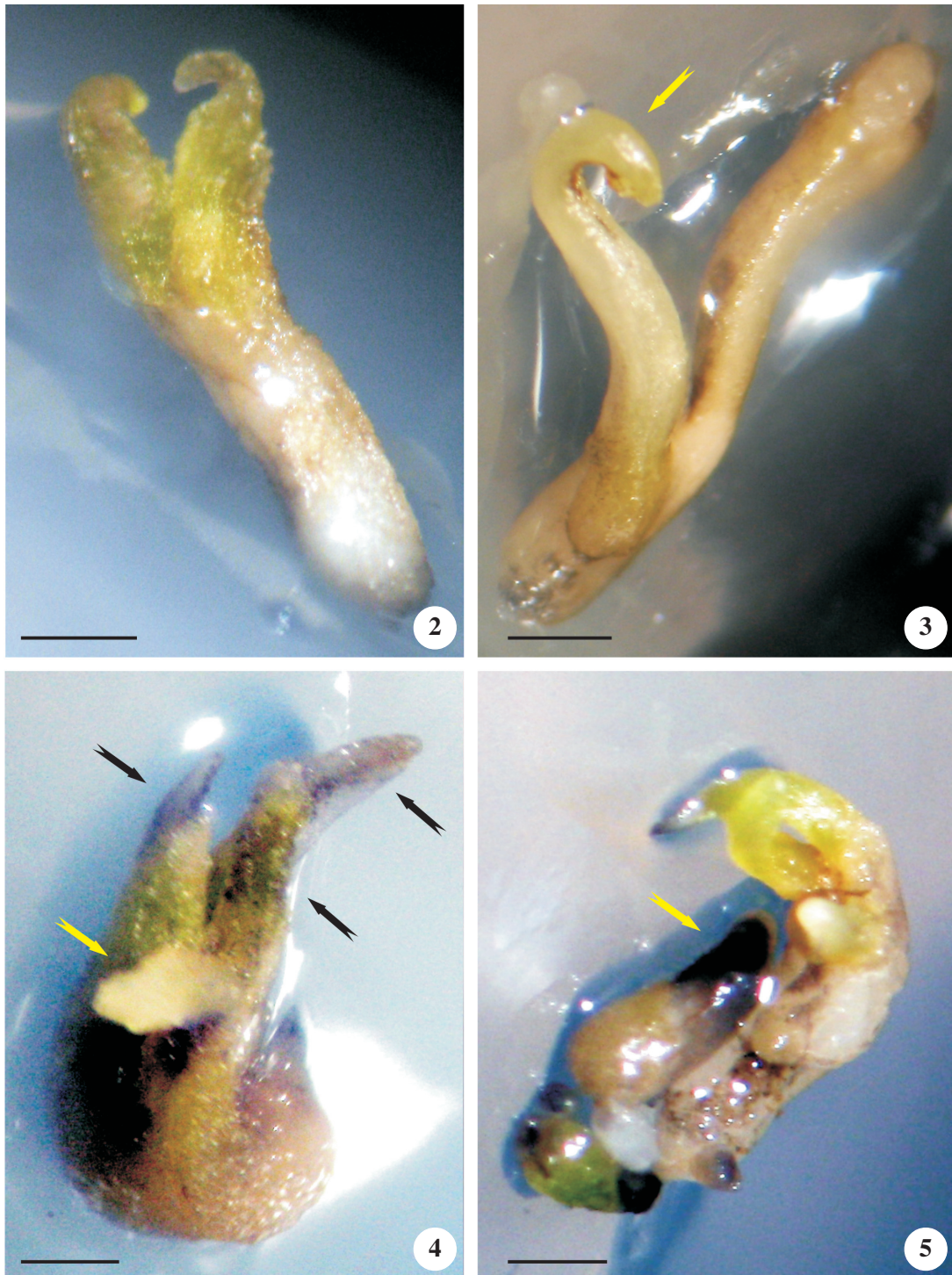


Figura 1. Porcentagem de embriões somáticos de *Acca sellowiana* em diferentes fases de desenvolvimento após 65 dias de cultura em meio LPM com 5 mg L⁻¹ de 2,4-D aplicado de forma contínua (□) ou pulsada (■).

Figure 1. Somatic embryos (%) of *Acca sellowiana* in different developmental phases after 65 days of culture in LPM medium containing 5 mg L⁻¹ 2,4-D applied continuously (□) or pulsed (■).

Morfologia dos embriões somáticos em fase cotiledonar – Durante o cultivo *in vitro* foram observados embriões com deformações de diversos tipos nos dois tratamentos, havendo predominância de embriões cupuliformes (figura 2), seguidos por aqueles com apenas um cotilédone (figuras 3 e 5) ou com mais de dois cotilédones (figura 4). Aos 65 dias de cultura, observou-se que 27% dos embriões do tratamento T1 apresentavam-se em fase cotiledonar. Destes, 82% eram deformados, sendo a



Figuras 2-5. Aspectos morfológicos de embriões somáticos de *Acca sellowiana* em fase cotiledonar obtidos após cultivo por 65 dias em meio LPm com 5 mg L⁻¹ de 2,4-D de forma contínua ou pulsada. 2. Embrião apresentando características normais. 3. Embrião cupuliforme ou com cotilédones fusionados (seta). 4. Embrião com mais de quatro cotilédones (setas). 5. Embrião com apenas um cotilédono (seta). Barra = 1 mm.

Figures 2-5. Morphological aspects of somatic embryos of *Acca sellowiana* in cotyledonary phase after 65 days of culture in LPm medium containing 5 mg L⁻¹ 2,4-D continuously or pulsed. 2. Embryos with normal features. 3. Cupuliform embryos or embryos with fused cotyledons (arrow). 4. Embryos with more than four cotyledons (arrow). 5. Embryos with only one cotyledon (arrow). Bar = 1 mm.

maioria cupuliforme (56%). Com relação ao tratamento com 2,4-D pulsado (T2), observou-se 16% de embriões somáticos cotiledonares, dos quais 62% eram deformados, sendo a maioria (60%) com cotilédones fusionados. Embora os explantes (embriões zigóticos) submetidos ao T1 tenham formado maior número de embriões somáticos em fase cotiledonar, a porcentagem de anomalias nesses embriões somáticos foi maior do que naqueles submetidos ao pulso com a auxina.

A formação de embriões somáticos anômalos em *A. sellowiana* foi reportada por Canhoto & Cruz (1994) e Canhoto *et al.* (2002), porém, as taxas de deformações não eram tão elevadas quanto às encontradas no presente trabalho. Contudo, Viviani (2004) encontrou 33% de deformações em embriões dessa mesma espécie na fase cotiledonar e mais recentemente Pescador *et al.* (2008a) reportaram elevada porcentagem de embriões somáticos com fenótipos alterados (76,3%) já no 40º dia de cultura na presença de 2,4-D. Entre esses, 12,2% consistiam de embriões fundidos, 40,4% apresentavam cotilédones concrecidos, 13% possuíam mais de dois cotilédones e 10,7% não possuíam cotilédones ou estes eram pouco desenvolvidos, incluindo embriões sem meristema apical caulinar. Esses autores sugeriram que as anomalias encontradas no desenvolvimento dos embriões somáticos poderiam estar relacionadas com distúrbios fisiológicos (alterações no transporte polar de auxinas) e/ou genéticos ocorridos nos tratamentos com 2,4-D.

Anormalidades em embriões somáticos já foram constatadas em várias espécies, como em soja (Lazzeri *et al.* 1987), pecan (Rodriguez & Wetzstein 1994) e linho (Dedicová *et al.* 2000), dentre outras. Assim como em *A. sellowiana*, os embriões somáticos dessas espécies apresentavam cotilédones pouco desenvolvidos e/ou fusionados, bem como alterações no ápice caulinar. A dificuldade na retomada do desenvolvimento desses embriões somáticos foi relacionada a anomalias no meristema apical caulinar e nos cotilédones, características que podem derivar de processos mutagênicos durante a embriogênese somática e também da produção inadequada de carboidratos de reserva (Mendes-da-Glória 1998). Segundo Konrádová *et al.* (2002), as células suspensoras do ápice caulinar são locais com alta atividade enzimática, como de sacarose sintase, metabolizando a sacarose para fornecimento de energia e carbono para as etapas iniciais do desenvolvimento embrionário zigótico. Assim, a inexistência desta etapa na indução e desenvolvimento dos embriões somáticos de *A. sellowiana*, não estimulando a produção e o acúmulo de teores adequadamente suficientes e/ou tipos específicos de carboidratos nesta fase de desenvolvimento tornariam os explantes inviáveis.

Efeito do tratamento a frio sobre os embriões somáticos – A transformação de pró-embriões para embriões globulares depende de condições adequadas para o estabelecimento de ciclos repetitivos de divisão celular e do controle restrito do processo de diferenciação, de tal maneira que as culturas sejam caracterizadas por alta porcentagem de células pró-embrionárias. Por outro lado, a estratégia para progressão das fases iniciais para as tardias consiste em interromper os ciclos repetitivos de divisão celular e fornecer estímulos fisiológicos e ambientais para a diferenciação, para que os ciclos de desenvolvimento e de maturação possam originar um grande número de embriões somáticos maduros (Guerra *et al.* 1999). No presente trabalho, o estímulo oferecido às culturas foi o uso de temperatura baixa, no momento em que os embriões se encontravam na fase final do desenvolvimento, conforme definido por Pescador *et al.* (2008a), com o intuito de estimular a retomada de crescimento e a formação de plântulas normais. Contudo, não houve regeneração de plântulas a partir dos embriões somáticos formados nos dois tratamentos com 2,4-D e um número significativo de embriões apresentou necrosamento evidente. No T1 (2,4-D de forma contínua), 50% dos embriões inoculados na fase globular permaneceram em estado latente. Nas fases embrionárias cordiforme e torpedo, 45% e 57% dos embriões necrosaram, respectivamente, enquanto na fase cotiledonar, 76% apresentaram características positivas quanto à retomada do desenvolvimento (figura 6). No tratamento com pulso de 2,4-D houve menor retomada de desenvolvimento, sendo observada necrose em grande parte dos embriões em todas as fases, o que ressalta a importância desta auxina não só na indução inicial como no desenvolvimento embrionário posterior. Apenas 15% dos embriões globulares e 30% dos cotiledonares tornaram-se verdes, apresentando, portanto, potencial para a retomada de desenvolvimento.

Variações nos carboidratos solúveis em diferentes fases do desenvolvimento embrionário e após exposição ao frio – O conteúdo total de carboidratos solúveis variou nas amostras analisadas no decorrer dos 65 dias de cultura, sendo observadas diferenças significativas entre todos os tratamentos (incluindo o controle), apenas em alguns tempos ao longo do período de análise, como pode ser observado na figura 7. Nos primeiros 15 dias de cultura (figura 7A), as amostras do T1 apresentaram aumento nos açúcares totais em relação ao controle, atingindo 11 mg g⁻¹ MF, quase o dobro do valor observado no controle. Do 20º ao 50º dia de cultivo também houve acentuada variação nos teores de açúcares solúveis em todos os tratamentos, com alterações significativas entre o controle e os tratados

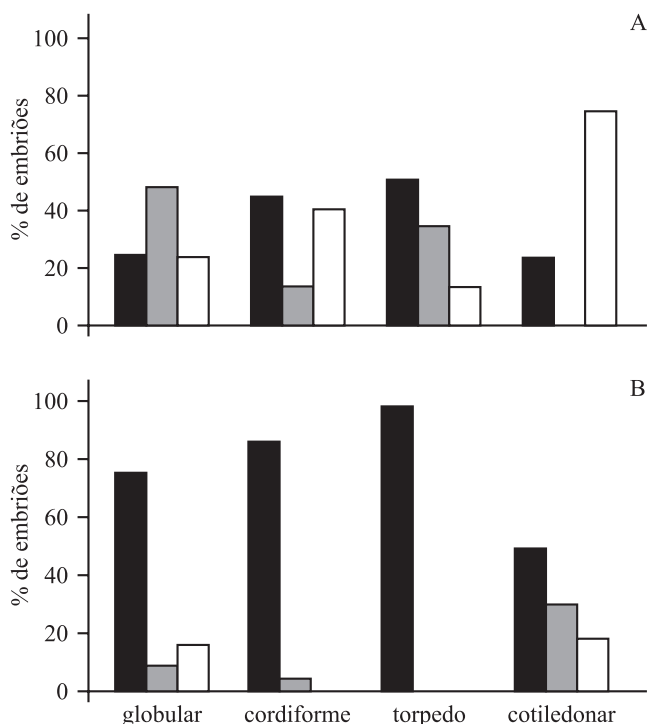


Figura 6. Porcentagem de embriões somáticos de *Acca sellowiana* nas diferentes fases de desenvolvimento (globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar) cerca de 15 dias após tratamento a 4 °C, apresentando necrose (■), quiescência (■) ou desenvolvimento normal (□). Cultivo em meio LPm com 5 mg L⁻¹ de 2,4-D de forma contínua (A) ou pulsada (B).

Figure 6. Somatic embryos (%) of *Acca sellowiana* in different developmental phases (globular, heart, torpedo and cotyledonary) after 15 days of cold treatment (4 °C), presenting embryos with necrosis (■), quiescence phase (■) or normal development (□). Culture in LPm medium containing 5 mg L⁻¹ 2,4-D continuously (A) or pulsed (B).

com 2,4-D. Observa-se que após 20 dias de cultivo, com a retirada deste regulador, houve redução significativa (cerca de 60%) no teor dos açúcares, a qual foi mais acentuada aos 35 dias de cultura (figura 7B). De modo geral, observou-se uma tendência de decréscimo no teor de carboidratos após a suspensão da auxina. Estudo prévio, comparando a embriogênese somática e zigótica dessa espécie apontou diferenças marcantes nos carboidratos não-estruturais, sendo geralmente encontrados valores mais baixos de açúcares solúveis e maior conteúdo de amido nos embriões somáticos, em relação aos zigóticos (Pescador *et al.* 2008b). A partir do 25º dia de cultura houve um incremento substancial de açúcares nos embriões zigóticos e não tão pronunciado nos embriões somáticos. No presente trabalho também houve pequeno

aumento de carboidratos solúveis nos embriões somáticos entre 20-25 dias de cultivo, principalmente nas amostras do controle.

Além de alterações morfológicas, nas fases finais do desenvolvimento embrionário geralmente ocorre acúmulo de substâncias necessárias para o desenvolvimento normal do embrião. Em *Picea abies*, o tratamento a frio resultou no acúmulo dos oligossacarídeos rafinose e estaquiase, semelhantemente ao que foi observado durante o processo natural de dessecação, na fase de maturação dos embriões zigóticos *in vivo* (Konradová *et al.* 2003).

No presente estudo, quando as culturas foram submetidas à temperatura baixa (4 °C), ao contrário do que era esperado, houve decréscimo significativo nos teores de carboidratos solúveis totais, tanto nas culturas controle, como nas tratadas com 2,4-D de forma contínua (figura 7C). Nos embriões tratados com 2,4-D de forma pulsada, neste mesmo período (figura 7C), houve uma tendência de aumento nos açúcares solúveis (de 10,2 mg g⁻¹ MF para 13,1 mg g⁻¹ MF). Contudo, esse acréscimo provavelmente não tenha sido suficiente para induzir o desenvolvimento embrionário normal, como observado por Pescador *et al.* (2008b). Vale ressaltar que esse tratamento foi o que apresentou o menor porcentual de retomada de desenvolvimento dos embriões somáticos. Recentemente Sasaki *et al.* (2008) mostraram que suspensões celulares bem sucedidas de *Arabidopsis thaliana* submetidas a baixas temperaturas apresentavam aumentos expressivos de açúcares solúveis, principalmente de sacarose e glucose na fase inicial de multiplicação celular, evidenciando a importância destes açúcares para a diferenciação e o posterior desenvolvimento normal.

O papel preciso dos açúcares solúveis e sua contribuição para o desenvolvimento embrionário não são claramente conhecidos. A sensibilidade de um determinado tecido vegetal aos diferentes açúcares endógenos pode influenciar a morfogênese por meio de alterações nas divisões celulares (Delrot *et al.* 2000). De acordo com Gibson (2003), a glucose e a sacarose, juntamente com outras moléculas sinalizadoras (fitormônios), atuam como mediadoras dos processos de embriogênese. Por outro lado, os teores endógenos e a disponibilidade desses açúcares podem ser afetados pela adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura. Assim, a combinação e a interação desses fatores *in vitro* podem alterar a regulação dos processos fisiológicos e consequentemente o controle da indução e o estabelecimento de culturas embriogênicas a partir de células somáticas.

As análises de composição dos açúcares presentes nas culturas embriogênicas de *A. sellowiana* tratadas com 2,4-D, bem como nas amostras controle, evidenciaram

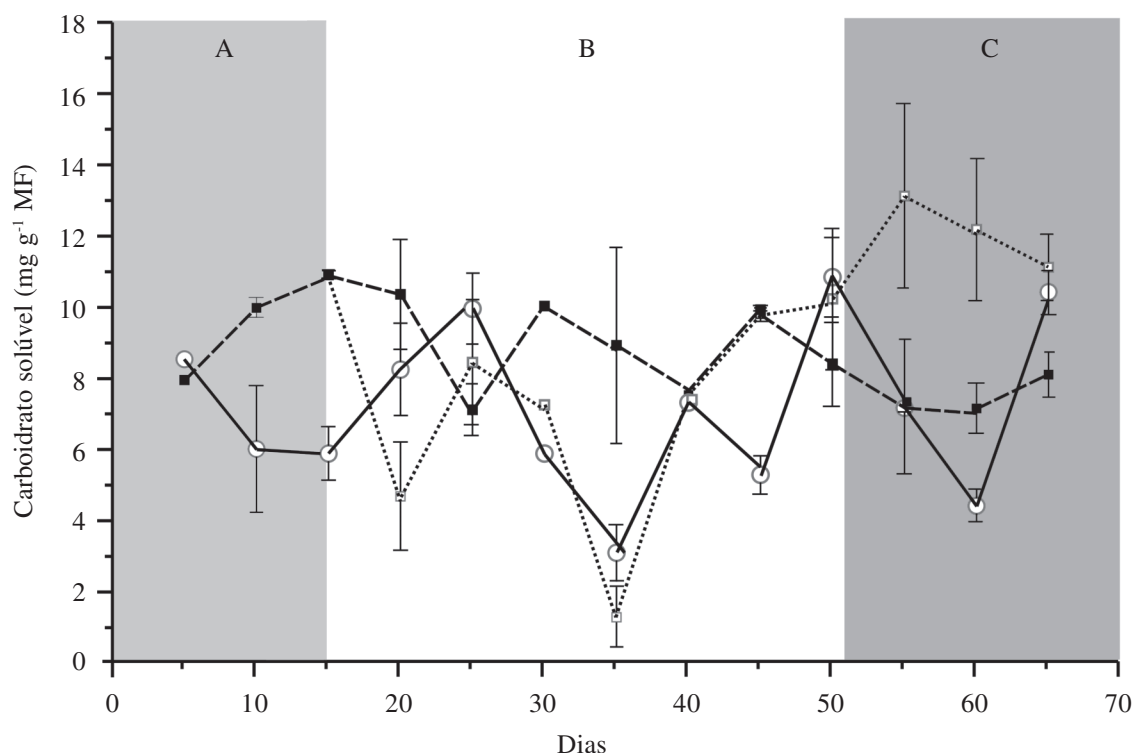


Figura 7. Teores de carboidratos solúveis totais (mg g^{-1} MF) em embriões somáticos de *Acca sellowiana* após 65 dias de cultura em meio LPM isento de regulador de crescimento (—○—), com 5 mg L^{-1} de 2,4-D de forma contínua (—■—) e pulsada (···□···) durante os primeiros 15 dias de cultura. A. Representa o período com pulso de 2,4-D. B. Período de desenvolvimento das culturas. C. Período de tratamento a frio (4°C). As barras representam o desvio padrão nos tempos em que houve diferença significativa ($P_{5\%}$) entre os tratamentos (ANOVA).

Figure 7. Total concentration of soluble carbohydrates (mg g^{-1} fresh mass) in somatic embryos of *Acca sellowiana* after 65 days of culture in LPM medium without growth regulator (—○—) or containing 5 mg L^{-1} 2,4-D continuously (—■—) or pulsed (···□···) during the first 15 days of culture. A. Represent the period of pulsed treatment with 2,4-D. B. Period of the growth culture. C. Period of cold treatment (4°C). Bars represent the standard deviation and are indicated where significant differences ($P_{5\%}$) among treatments are found (ANOVA).

a presença de *myo*-inositol, glucose, frutose, sacarose e rafinose em todas as amostras (figura 8A), variando apenas na concentração de cada componente. O *myo*-inositol é um constituinte importante da membrana plasmática (Moore 1982) e sua presença em sistemas de cultivo *in vitro* pode inativar auxinas, por meio da formação do complexo auxina-inositol (Cohen & Bandurski 1982), além de outras funções essenciais no metabolismo celular. No presente estudo, este açúcar álcool foi observado em baixas concentrações praticamente em todas as amostras analisadas, variando de $0,03$ a $0,57 \text{ mg g}^{-1}$ MF, e diminuindo ainda mais ao longo do período experimental (figura 8B). Glucose e frutose foram os açúcares predominantes em todas as amostras analisadas. Os maiores teores de glucose foram encontrados no controle e nos embriões tratados com 2,4-D até 20-40 dias de cultura (figura 8C). Como

pode ser observado, o maior valor foi detectado aos 10 dias de cultivo nas amostras provenientes do tratamento contínuo com 2,4-D, equivalendo a $4,6 \text{ mg g}^{-1}$ MF. Em relação à frutose, que também alcançou altos teores em relação aos demais açúcares, sua presença foi detectada de forma relativamente constante até os 55 dias de cultura nas amostras controle, atingindo $3,0 \text{ mg g}^{-1}$ MF aos 10 dias (figura 8D). As amostras do T1 apresentaram frutose até 20 dias de cultura, enquanto nas do T2 este açúcar foi detectado somente de 20 a 30 dias de cultivo.

De acordo com Baud *et al.* (2002), os carboidratos solúveis são mais importantes nas fases iniciais do processo de formação do embrião, atuando como fonte de energia, esqueletos carbônicos e/ou como sinalizadores. Confirma-se, assim, com o presente trabalho, a presença relevante de glucose e frutose nas culturas controle,

correspondentes ao embrião zigótico de *Acca sellowiana*, bem como nas fases iniciais da embriogênese somática, diminuindo seus teores nas fases finais desse processo. Esses resultados são semelhantes aos reportados por Pescador *et al.* (2008b), que encontraram maior teor de glucose nos primeiros 12 dias de cultura, quando os embriões apresentavam-se na fase globular, diminuindo, posteriormente, naqueles em fase cotiledonar.

Os efeitos da sacarose na indução, viabilidade e maturação de embriões somáticos têm sido investigados extensivamente, e acredita-se que este açúcar seja

responsável pela ação protetora contra a dessecação, devido à sua capacidade de estabilizar proteínas da membrana plasmática (Crowe & Hoekstra 1992). No presente estudo, apesar do teor de sacarose no meio de indução ter sido mantido durante os 65 dias de cultura em todos os tratamentos, seu conteúdo endógeno variou substancialmente e foi de 10 a 100 vezes inferior aos níveis de glucose e frutose, evidenciando a presença de alta atividade hidrolítica nessas culturas. A figura 8E mostra que o maior teor de sacarose foi encontrado aos 5 dias de cultura (0,94 mg g⁻¹ MF) nas amostras tratadas

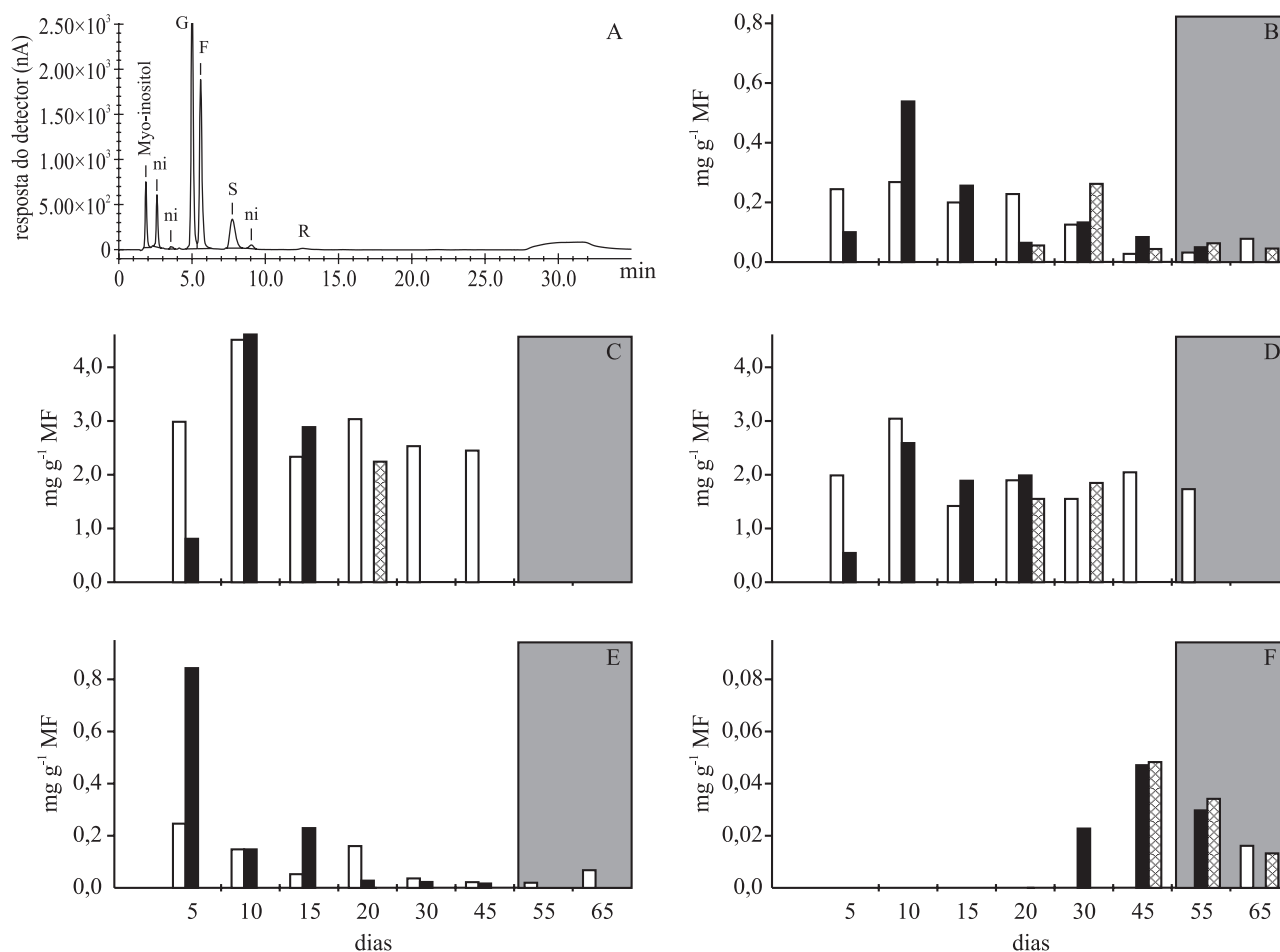


Figura 8. Perfil cromatográfico dos carboidratos solúveis (A) de embriões somáticos de *Acca sellowiana* com 30 dias de cultura em meio isento de regulador de crescimento (controle). Variações nos carboidratos solúveis individuais (mg g⁻¹ MF): *myo*-inositol (B), glucose (C), frutose (D), sacarose (E) e rafinose (F) nos embriões somáticos da espécie cultivados por 65 dias em meio LPm isento de 2,4-D (□) controle, ou com 5 mg L⁻¹ de 2,4-D de forma contínua (■) ou pulsada (⊠). A área cinza refere-se ao período de tratamento a frio (4 °C).

Figure 8. Chromatographic profile of soluble carbohydrates (A) of somatic embryos of *Acca sellowiana* after 30 days cultured without growth regulators (control). Variations in the content of individual soluble carbohydrates (mg g⁻¹ fresh mass): *myo*-inositol (B), glucose (C), fructose (D), sucrose (E) and raffinose (F) from somatic embryos cultured in LPm medium for 65 days without growth regulator (□) control, or containing 5 mg L⁻¹ 2,4-D continuously (■) or pulsed (⊠). The grey area represents the cold treatment (4 °C).

com 2,4-D de forma contínua. Após 30 dias, os teores de sacarose foram drasticamente diminuídos em todas as amostras. Como se sabe, glicose, frutose e sacarose estão geralmente associadas a fases distintas do desenvolvimento embrionário. Acredita-se que a sacarose possa afetar a diferenciação celular e o armazenamento de substâncias de reserva, enquanto as hexoses teriam papel relevante para o crescimento e o metabolismo celular (Weber *et al.* 1997). Os baixos níveis de sacarose nas amostras sugerem uma intensa atividade invertásica, acompanhada de aumento nas proporções das hexoses constituintes desse dissacarídeo, o que pode ter contribuído para o desenvolvimento anômalo dos embriões somáticos nessas culturas.

A rafinose é um açúcar solúvel que pode atuar como reserva e, também, interagir com a sacarose, impedindo sua cristalização, fato que levaria o embrião à deterioração (Bruni & Leopold 1992). Este açúcar foi encontrado em teores muito baixos nas amostras analisadas, sendo detectado somente após 30 dias de cultura nos tratamentos com 2,4-D (figura 8F). No período inicial de cultivo (5-20 dias) e nos demais tratamentos, a rafinose não foi detectada nas análises realizadas por HPAEC/PAD. Contudo, para o período de frio, era esperado um acúmulo desse açúcar nos embriões somáticos de *A. sellowiana*, como observado para outras espécies (Lipavská *et al.* 2000, Konradová *et al.* 2003). Apesar de haver aumento na quantidade de carboidratos solúveis totais no tratamento com pulso de auxina (figura 7), os teores de rafinose foram mínimos, sendo cerca de 50 vezes inferiores aos valores encontrados por Pescador *et al.* (2008b) e diminuíram ainda mais com o tratamento a frio (figura 8F). Notou-se que o aumento de rafinose ocorreu aos 45 dias de cultura, portanto antes mesmo do tratamento a frio, que reduziu a quantidade desse açúcar no final do experimento, produzindo um efeito inverso ao esperado.

Os resultados obtidos evidenciaram a importância da definição da fase de desenvolvimento das culturas embriogênicas somáticas para o acúmulo de oligossacarídeos envolvidos na tolerância ao frio. Esses açúcares parecem desempenhar papel relevante nas fases tardias do desenvolvimento embrionário dessa espécie, como já enfatizado por Pescador *et al.* (2008b), embora os teores detectados no presente trabalho tenham sido muito baixos. Além disso, o tratamento a frio não induziu o aumento dos teores de carboidratos solúveis provavelmente pelo fato de ter sido aplicado em fase não apropriada no período de maturação do desenvolvimento embrionário. No tratamento com 2,4-D de forma contínua também ocorreram variações semelhantes ao controle, como pode ser observado na figura 8.

Em resumo, os embriões somáticos de *A. sellowiana* expostos por 15 dias à temperatura baixa apresentaram características positivas quanto à retomada do desenvolvimento, porém, estes indícios não resultaram na regeneração normal das plântulas, conforme esperado. A quantificação de açúcares solúveis totais evidenciou que os teores variaram no decorrer do tempo de cultura, com tendência a aumentar nos embriões tratados com pulso hormonal. Contudo, o tratamento com temperatura baixa não resultou num incremento expressivo dos açúcares solúveis nos embriões somáticos de *A. sellowiana*, como era esperado, particularmente para as fases tardias do desenvolvimento embrionário, nas quais os teores de carboidratos solúveis se destacam, principalmente com elevação de sacarose e acúmulo de rafinose (Pescador *et al.* 2008b). A queda nos teores de rafinose no final do período experimental, após a exposição ao frio, e outras alterações morfofisiológicas no desenvolvimento dos embriões poderiam ser responsáveis pela mudança na rota da embriogênese somática dessa espécie, não conduzindo para a formação de plântulas normais.

Por se tratar de um sistema artificial, a embriogênese somática conta com a sincronia de sinais e respostas, desencadeados por diversos fatores endógenos e exógenos da cultura. Os resultados deste trabalho indicam a necessidade de monitoramento preciso das fases de desenvolvimento da cultura e de análises minuciosas de outros componentes celulares importantes, como aminoácidos, proteínas e reguladores de crescimento, dentre eles as citocininas, que sabidamente favorecem a translocação e a utilização de carboidratos em diferentes tecidos, possibilitando assim melhor compreensão do processo de regeneração de plântulas normais de *Acca sellowiana*, a partir de culturas embriogênicas.

Agradecimentos – Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo 2005/04139-7) pelo apoio financeiro ao projeto e ao Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelas bolsas de iniciação científica (Programa PIBIC/FURB) concedida a L. H. G. Mengarda, de apoio técnico concedida a M. P. Monteiro e de produtividade científica concedida a R. C. L. Figueiredo-Ribeiro. Os autores também agradecem à Dra. Maria Angela Machado de Carvalho pela revisão do Abstract.

Referências bibliográficas

- ATTREE, S.M., POMEROY, M.K. & FOWKE, L.C. 1992. Manipulation of conditions for the culture of somatic embryos of white spruce for improved triacylglycerol biosynthesis and desiccation tolerance. *Planta* 187:395-404.

- BAUD, S., BOUTIN, J.P., MIQUEL, M., LEPINIEC, L. & ROCHAT, C. 2002. An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiology and Biochemistry* 40:151-160.
- BRUNI, E. & LEOPOLD, A.C. 1992. Pool of water in anhydrobiotic organism: a thermally stimulated depolarization current study. *Biophysical Journal* 63:663-672.
- CANGAHUALA-INOCENTE, G.C., STEINER, N., SANTOS, M. & GUERRA, M.P. 2004. Morphohistological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. *Protoplasma* 224:33-40.
- CANHOTO, J.M. & CRUZ, G.S. 1994. Improvement of somatic embryogenesis in *Feijoa sellowiana* Berg (Myrtaceae) by manipulation of culture media. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 30:21-25.
- CANHOTO, J.M. & CRUZ, G.S. 1996. *Feijoa sellowiana* Berg (pineapple guava). *In Tree IV. Biotechnology in agriculture on forestry* (Y.P.S. Bajaj, ed.). Springer-Verlag, Berlin, p.156-171.
- CANHOTO, J.M., LOPES, M.L. & CRUZ, G. 2002. Somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle (Myrtaceae). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 57:13-21.
- CARRIER, D.J., KENDALL, E.J., BOCK, C.A., CUNNINGHAM, J.E. & DUNSTAN, D.I. 1999. Water content, lipid deposition, and (+)- abscisic acid content in developing white spruce seeds. *Journal of Experimental Botany* 50:1359-1364.
- CHANPRAME, S., KUO, T.M. & WIDHOLM, J.M. 1998. Soluble carbohydrate content of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.: somatic and zygotic embryos during development. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 34:64-68.
- COHEN, J.D. & BANDURSKI, R.S. 1982. Chemistry and physiology of the bound auxins. *Annual Review of Plant Physiology* 33:403-430.
- CROWE, J.H. & HOEKSTRA, F.A. 1992. Anhydrobiosis. *Annual Review of Plant Physiology* 54:597-599.
- CRUZ, G.S., CANHOTO, J.M. & ABREU, M.A.V. 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of *Acca sellowiana* Berg. *Plant Science* 66:263-270.
- DEDICOVÁ, B., HRICOVÁ, A., SAMAJ, J., OBERT, B., BOBÁK, M. & PRET'OVÁ, A. 2000. Shoots and embryo-like structures regenerated from cultured flax (*Linum usitatissimum* L.) hypocotyl segments. *Journal of Plant Physiology* 157:327-334.
- DELROT, S., ATANASSOVA, R. & MAUROUSSET, L. 2000. Regulation of sugar, amino acid and peptide plant membrane transporter. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465:281-306.
- DUBOIS, M., GUILLES, A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. & SMITH, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28:350-355.
- FLINN, B.S., ROBERTS, D.R., NEWTON, C.H., CYR, D.R., WEBSTER, F.B. & TAYLOR, I.E.P. 1993. Storage protein gene expression in zygotic and somatic embryos of interior spruce. *Physiologia Plantarum* 89:719-730.
- GIBSON, S.I. 2003. Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signaling network. *Journal of Experimental Botany* 55:253-264.
- GUERRA, M.P., TORRES, A.C., TEIXEIRA, J.B. 1999. Embriogênese somática e semente sintética. *In Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Volume 2 (A.C. Torres, L.S. Caldas & J.A. Buso, eds.). Embrapa-SPI/CNPq, Brasília, p.533-568.
- GUERRA, M.P., DAL VESCO, L.L., DUCROQUET, J.P.H.J., NODARI, R.O. & REIS, M. 2001. Somatic embryogenesis in goiabeira serrana: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 13:117-128.
- GUERRA, M.P., PESCADOR, R., DAL VESCO, L.L., NODARI, R.O. & DUCROQUET, J.P.H.J. 1997. *In vitro* morphogenesis in *Feijoa sellowiana*: somatic embryogenesis and plant regeneration. *Acta Horticulturae* 452:27-36.
- GUPTA, P.K., TIMMIS, R. & CARLSON, W.C. 1993. Somatic embryogenesis: a possible tool for large-scale propagation of forestry species. *In Advances in developmental biology and biotechnology of higher plants* (W.Y. Soh, J.R. Liu & A. Komamine, eds.). Korean Soc. Plant. Tissue Culture, Korea, p.18-37.
- HOEKSTRA, F.A. & GOLOVINA, E.A. 1999. Membrane behavior during dehydration: implication for desiccation tolerance. *Russian Journal of Plant Physiology* 46:295-306.
- JENIK, P.D. & BARTON, M.K. 2005. Surge and destroy: the role of auxin in plant embryogenesis. *Development* 132:3577-3585.
- JIMÉNEZ, V.M. 2005. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation* 47:91-110.
- KONRÁDOVÁ, H., LIPAVSKÁ, H., ALBRECHTOVÁ, J. & VREUGDENHIL, D. 2002. Sucrose metabolism during somatic and zygotic embryogenesis in Norway spruce: content of soluble saccharides and localization of key enzyme activities. *Journal of Plant Physiology* 159:387-396.
- KONRÁDOVÁ, H., GRIGOVÁ, M. & LIPAVSKÁ, H. 2003. Cold-induced accumulation of raffinose family oligosaccharides in somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 39:425-427.
- LAZZERI, P.A., HILDEBRANDT, D.F. & COLLINS, G.B. 1987. Soybean somatic embryogenesis: effect of hormones and culture manipulations. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 10:197-208.
- LIPAVSKÁ, H., SVOBODOVÁ, H. & ALBRECHTOVÁ, J. 2000. Annual dynamics of the content of non-structural saccharides in the context of structural development of vegetative buds of Norway spruce. *Journal of Plant Physiology* 157:365-373.

- LOU, H., OBARAOKEYO, P., TAMAKI, M. & KAKO, S. 1996. Influence of sucrose concentration on *in vitro* morphogenesis in cultured cucumber cotyledon explants. *Journal of Horticultural Science* 71:497-502.
- MENDES-DA-GLÓRIA, F.J.M. 1998. Hibridização somática entre laranja “Caipira” e limão “Cravo” através de fusão de protoplastos. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- MOORE, J.R. 1982. Phospholipid biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology* 33:235-259.
- PESCADOR, R., KERBAUY, G.B., VIVIANI, D. & KRAUS, J.E., 2008a. Anomalous somatic embryos in *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 31:155-164.
- PESCADOR, R., KERBAUY, G.B., KRAUS, J.E., FERREIRA, W.M., GUERRA, M.P. & FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. 2008b. Changes in soluble carbohydrates and starch amounts during somatic and zygotic embryogenesis of *Acca sellowiana* (Myrtaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 44:289-299.
- POND, S.E., VON ADERKAS, P. & BONGA, J.M. 2002. Improving tolerance of somatic embryos of *Picea glauca* to flash desiccation with a cold treatment (desiccation after cold acclimation). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 38:334-341.
- RODRIGUEZ, A.P.M. & WETZSTEIN, H.Y. 1994. The effect of auxin type and concentration on pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryo morphology and subsequent conversion into plants. *Plant Cell Reports* 13:607-611.
- SASAKI, Y., TAKAHASHI, K., OONO, Y., SEKI, M., YOSHIDA, R., SHINOZAKI, K. & UEMURA, M. 2008. Characterization of growth-phase-specific responses to cold in *Arabidopsis thaliana* suspension-cultured cells. *Plant, Cell and Environment* 31:354-365.
- VERMA, D.C. & DOUGALL, D.K. 1977. Influence of carbohydrates on quantitative aspects of growth and embryo formation in wild carrot suspension cultures. *Plant Physiology* 59:81-85.
- VIVIANI, D. 2004. Efeitos da refinose e do tratamento a frio na retomada do desenvolvimento de embriões somáticos de *Feijoa sellowiana* Berg (Myrtaceae). Trabalho de conclusão de curso, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau.
- VON ARNOLD, S. & ERIKSSON, T. 1981. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus cordata*. *Canadian Journal of Botany* 59:870-874.
- WEBER, H., BORISJUK, L. & WOBUS, U. 1997. Sugar import and metabolism during seed development. *Trends in Plant Science* 2:169-174.