

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

Geís Ferreira Neves

**RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS DURANTE A INDUÇÃO DE
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM EMBRIÕES ZIGÓTICOS E FOLHAS
IMATURAS DE *Butia capitata***

Geís Ferreira Neves

**RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS DURANTE A INDUÇÃO DE
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM EMBRIÕES ZIGÓTICOS E FOLHAS
IMATURAS DE *Butia capitata***

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Produção Vegetal.

Orientador: Paulo Sérgio Nascimento Lopes

Montes Claros-MG

2025

Neves, Geís Ferreira.

N518r
2025 Respostas morfofisiológicas durante a indução de embriogênese somática em embriões zigóticos e folhas imaturas de *Butia capitata* [manuscrito]/ Geís Ferreira Neves. Montes Claros, 2025.

134 f.: il

Tese (doutorado) - Área de concentração em Produção Vegetal. Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias.

Orientador: Paulo Sérgio Nascimento Lopes

Banca examinadora: Claudinéia Ferreira Nunes, Leonardo Monteiro Ribeiro, Joyce Doria Rodrigues Soares, Cristina de Paula Santos Martins.

Inclui referências: f. 37-46; f. 87-96; f. 124-134.

1. Tecidos vegetais -- Cultura e meios de cultura -- Teses. 2. Morfogênese -- Teses. 3. Plantas -- Propagação in vitro -- Teses. 4. Plantas dos cerrados -- Teses. 5. Acido diclorofenoxiacético -- Teses. 6. Picloram -- Teses. I. Lopes, Paulo Sérgio Nascimento. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 631.52


ATA DE DEFESA DE TESE

Aos 31 dias do mês de outubro de 2025 às 8:30 horas, sob a Presidência do Professor Paulo Sérgio Nascimento Lopes, D. Sc. (Orientador - UFMG/ICA) e com a participação dos Professores Claudinéia Ferreira Nunes, D. Sc. (UFMG/ICA), Joyce Doria Rodrigues Soares, D. Sc. (UFLA), Leonardo Monteiro Ribeiro, D. Sc. (Unimontes) e da Pós-Doutoranda Cristina de Paula Santos Martins, D. Sc. (UFMG/ICA), reuniu-se, presencialmente, a Banca de tese de **Geís Ferreira Neves**, aluna do Curso de Doutorado em Produção Vegetal. O resultado da defesa de tese intitulada: **“Respostas morfofisiológicas durante a indução de embriogênese somática em embriões zigóticos e folhas imaturas de *Butia capitata*”** sendo a aluna considerada aprovado. E, para constar, eu, Professor Paulo Sérgio Nascimento Lopes, Presidente da Banca, lavrei a presente ata que depois de lida e aprovada, será assinada por mim e pelos demais membros da Banca examinadora.


OBS.: A aluna somente receberá o título após cumprir as exigências do **ARTIGO 65** do regulamento do Curso de Doutorado em Produção Vegetal, conforme apresentado a seguir:

Art. 65 Para dar andamento ao processo de efetivação do grau obtido, o candidato deverá, após a aprovação de sua Dissertação ou Tese e da realização das modificações propostas pela banca examinadora, se houver, encaminhar à secretaria do Colegiado do Programa, com a anuência do orientador, 1 (um) exemplar impresso e 1 (um) exemplar eletrônico da dissertação ou tese, no prazo de 60 (sessenta) dias.


Montes Claros, 31 de outubro de 2025.

Documento assinado digitalmente
 CLAUDINEIA FERREIRA NUNES
 Data: 03/11/2025 14:53:45-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Claudinéia Ferreira Nunes
 Membro

Documento assinado digitalmente
 JOYCE DORIA RODRIGUES CARVALHO
 Data: 03/11/2025 16:43:34-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Joyce Doria Rodrigues Soares
 Membro

Documento assinado digitalmente
 LEONARDO MONTEIRO RIBEIRO
 Data: 03/11/2025 16:32:35-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Leonardo Monteiro Ribeiro
 Membro

Documento assinado digitalmente
 CRISTINA DE PAULA SANTOS MARTINS
 Data: 04/11/2025 18:26:55-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Cristina de Paula Santos Martins
 Membro

Documento assinado digitalmente
 PAULO SERGIO NASCIMENTO LOPES
 Data: 31/10/2025 11:46:46-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Paulo Sérgio Nascimento Lopes
 Orientador

Dedico

À minha mãe, Luciana de Fátima Ferreira, pilar da minha vida, que sempre me apoiou com amor incondicional, acreditou em mim mesmo nos momentos em que eu duvidei e jamais desistiu dos meus sonhos. Seu exemplo de força, coragem e generosidade foi e sempre será minha maior inspiração.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela presença constante em minha vida. Pela luz nos momentos de escuridão, pela força nos momentos difíceis e pela paz que sustentou minha caminhada.

À minha família, meu alicerce e abrigo em todos os momentos. Agradeço pelo amor, paciência e apoio incondicional ao longo desta jornada. Em especial, à minha mãe Luciana e à minha irmã Lucinéia.

Ao meu companheiro Vinícius Almeida, que caminhou ao meu lado com amor, paciência e força. Obrigada por acreditar em mim, por ser meu porto seguro e por me lembrar todos os dias do valor da parceria verdadeira.

Ao Professor Paulo Sérgio Lopes pela orientação e pela paciência ao longo desta caminhada. Os ensinamentos compartilhados e os valiosos conselhos foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

Às minhas amigas do coração Bruna, Lubia, Gislaine e Lidiane. Cada encontro, ligação ou mensagem de apoio de vocês, ao longo desta jornada, foi fundamental.

Aos colegas, amigos e companheiros da pós-graduação: Adriene, Felipe, Sara, Débora, Sandra, Caroline, Janete, Karla, Verônica e Ana Luiza. Obrigada pelo carinho e amizade, pelos encontros e conversas que foram fundamentais neste processo.

Ao Grupo de Estudos GEFEN, meu sincero agradecimento pela troca de conhecimentos, apoio mútuo e amizade cultivada, ao longo desta jornada, em especial: Morgana, Maria, Natália, Emilly e Fábio.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação pela grande contribuição e ensinamentos compartilhados, em especial: Claudinéia e Clívia.

Aos funcionários do Instituto de Ciências Agrárias, em especial, Gilson. Sua alegria e companheirismo, com certeza, fizeram diferença na execução dos trabalhos ao longo desta jornada.

À banca pela disponibilidade e contribuições.

À Universidade Federal de Minas Gerais, em especial, ao Instituto de Ciências Agrárias pelo Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, pela oportunidade de realização do meu doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPQ), agradeço pelo apoio institucional e financeiro concedido para a realização deste estudo.

“A mais bela coisa que podemos vivenciar é o mistério. Ele é a fonte de qualquer arte verdadeira e qualquer ciência. Aquele que desconhece esta emoção, aquele que não para mais para pensar e não se fascina, está como morto: seus olhos estão fechados”.

Albert Einstein

RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS DURANTE A INDUÇÃO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM EMBRIÕES ZIGÓTICOS E FOLHAS IMATURAS DE *Butia capitata*

RESUMO

A *Butia capitata* (Mart.) Becc., conhecida como coquinho-azedo, é uma espécie autóctone do Cerrado brasileiro e de grande importância socioeconômica para a população local. Estudos voltados à propagação da espécie, como a embriogênese somática, são importantes, pois contribuem para a conservação de germoplasma, melhoramento genético e na formação de pomares clonais altamente produtivos. O presente trabalho objetivou investigar aspectos preliminares de indução da embriogênese somática em embriões zigóticos injuriados e folhas imaturas *B. capitata*, além dos usos de meios de cultivo e reguladores de crescimento. Injúrias mecânicas no embrião zigótico associadas ao meio de cultivo “Coquinho”, desenvolvido pelos autores, favorecem a formação de calos com potencial embriogênico. Além disso, os tratamentos com 50 μM de 2,4-D + 300 μM de picloram e 300 μM de picloram proporcionam maior formação de calos com características embriogênicas. A análise do perfil hormonal do tecido vegetal tratado com esses reguladores mostra maior concentração de auxinas, o que confirma a relevância do 2,4-D e picloram na indução embriogênica. Nas folhas, o tratamento 300 μM de 2,4D é superior para formação de calos com potencial embriogênico. Os resultados obtidos são promissores para a indução da embriogênese somática em *Butia capitata*, espécie de elevado valor socioeconômico e relevância para a conservação do bioma Cerrado.

Palavras-chave: cultura de tecidos; meio de cultivo; morfogênese *in vitro*; palmeiras nativas do cerrado; 2,4 D; picloram.

MORPHOPHYSIOLOGICAL RESPONSES DURING THE INDUCTION OF SOMATIC EMBRYOGENESIS IN ZYGOTIC EMBRYOS AND IMMATURE LEAVES OF *Butia capitata*

ABSTRACT

Butia capitata (Mart.) Becc., known as *coquinho-azedo*, is a native species of the Brazilian Cerrado and of great socioeconomic importance to the local population. Studies focused on the propagation of this species, such as somatic embryogenesis, are essential, as they contribute to germplasm conservation, genetic improvement, and the establishment of highly productive clonal orchards. In this context, the present study aimed to investigate preliminary aspects of somatic embryogenesis induction in injured zygotic embryos and immature leaves of *B. capitata*, as well as the effects of different culture media and growth regulators. Mechanical injuries to the zygotic embryos associated with the "Coquinho" culture medium, developed by the authors, favored the formation of calluses with embryogenic potential. Furthermore, treatments with 50 μM 2,4-D + 300 μM picloram and 300 μM picloram promoted greater formation of calluses with embryogenic characteristics. Analysis of the hormonal profile of plant tissues treated with these regulators revealed a higher concentration of auxins, confirming the relevance of 2,4-D and picloram in embryogenic induction. In immature leaves, the 300 μM 2,4-D treatment was superior for the formation of calluses with embryogenic potential. The results obtained are promising for the induction of somatic embryogenesis in *Butia capitata*, a species of high socioeconomic value and great relevance for the conservation of the Cerrado biome.

Keywords: tissue culture; culture medium; *in vitro* morphogenesis; native palm trees of the cerrado biome; 2,4-D; picloram.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1- Esquema da embriogênese somática indireta com a utilização da auxina (2,4D). Adaptado de STEINER, 2008. Nota: 2,4D: 2,4 diclorofenoxiacético; MPE: massas pró-embriogênicas; ABA: ácido abscísico.

CAPÍTULO I

Experimento 1: Efeito do meio e da injúria na indução da embriogênese somática

Figura 1- Palmito (A, B), inflorescências dentro da espata (C) e sem espata (D) e planta em processo de regeneração, após 40 dias da retirada do palmito, em *B. Capitata* (E).

Figura 2- Embriões zigóticos de *B. capitata*, submetidos ao esmagamento (A), seccionamento transversal (B), embrião intacto (C) e cultivados em *in vitro*, apresentando a primeira bainha foliar (D), calo estrutura globular (E) e irregular (F). b1, primeira bainha; CEI, calo com estrutura irregular; CEG, calo com estrutura globular; ha, haustório; pc, pecíolo cotiledonar; rp, -região proximal do embrião (origem pecíolo cotiledonar); rd, região distal do embrião (origem haustório).

Figura 3- Dispersão gráfica dos dois primeiros Componentes principais (CP) para as variáveis estudadas. MS_ESM (meio MS e injúria de esmagamento), MS_SEC (meio MS e injúria de seccionamento), MS_AI (meio MS e ausência de injúria), COQ_ESM (meio coquinho (COQ) e injúria de esmagamento), COQ_SEC (meio coquinho (COQ) e injúria de seccionamento), COQ_AI (meio coquinho (COQ) e ausência de injúria). OXI_50 (número de explantes oxidados aos 50 dias de cultivo), PC.10 (número de explantes com alongamento do pecíolo cotiledonar aos 10 dias de cultivo), PC.50 (número de explantes com alongamento do pecíolo cotiledonar aos 50 dias de cultivo), PA.10 (número de explantes com presença da primeira bainha, parte aérea aos 10 dias de cultivo), PA.50 (número de explantes com presença da primeira bainha, parte aérea aos 50 dias de cultivo), CEI.10 (número de explantes com formação de calos com estrutura irregular aos 10 dias de cultivo), CEI.50 (número de explantes com formação de calos com estrutura irregular aos 50 dias de cultivo), CEG.10 (número de explantes com formação de calos com estrutura globular aos 10 dias de cultivo), CEG.50 (número de explantes com formação de calos com estrutura globular aos 50 dias de cultivo).

Figura 4- Aspectos morfológicos e anatômicos do embrião de coquinho azedo (*Butia capitata*) não inoculado. Em A, região proximal (rp) e região distal (rd). Em B, corte anatômico da região distal. Em C corte anatômico da região proximal, mostrando o eixo embrionário. Em D detalhe do eixo embrionário, destacando o pró-meristema radicular (pr), pró-câmbrio (pb) e cavidade cotiledonar (cc). rd- região distal, rp- região proximal, pr- pro-meristema radicular, cc- cavidade cotiledonar, mf-meristema fundamental, pb- procâmbio.

Figura 5- Calos e estruturas calosas formadas em 10 dias de cultivo. Em A, B, C, D calo originário de MS/SEC. Em B, seta preta indicada por (fv) mostra formação de feixes vasculares. Em C, seta preta indica formação de elementos traqueais, contendo células características do xilema. Em E e F, calo formado em MS/ESM. Em H e I, calo formado em COQ/SEC e, em K, L, M, calo formado em COQ/ESM. Em I, setas pretas indicadas por (ei) mostram espaços intercelulares, setas pretas indicadas por (cm) indicam centros meristemáticos e setas pretas indicadas por (pd) indicam formação de protoderme. rd- região distal, rp- região proximal, te- tecido remanescente do explante, pd- protoderme, ei- espaços intercelulares, fv- feixes vasculares, xi- células características do xilema, b1- primeira bainha, cc- cavidade cotiledonar, cm- centro meristemático.

Figura 6- Calos formados no tratamento meio COQ sob injúria ESM (A, B, C, D, E, F, G) e meio MS sob injúria ESM (H, I, J, K) aos 15 dias de cultivo. Em B e F, setas pretas indicadas por (ei) mostram espaços intercelulares. Em B, seta preta indicada por (fv) mostra formação de feixes vasculares. Em C e F, setas pretas indicadas por (pd) mostram formação de protoderme. Em G, seta preta indica formação de elementos traqueais, contendo células características do xilema. Em K, setas pretas indicam centros meristemáticos. rd- região distal, ei- espaço intercelular, te- tecido do embrião, fv- feixe vascular, cc- cavidade cotiledonar, eo- eófilo 1, b1- bainha 1, b2- bainha 2, pd- protoderme, xi- protoxilema.

Figura 7- Cortes anatômicos dos calos observados após 30 dias após inoculação. Em A, B, C e D, estruturas formadas a partir do tratamento (COQ/ESM); em B e C, detalhe ampliado da estrutura semelhante a pró-embrião globular, seta preta indicada por (pd) mostra formação de protoderme, seta preta indicada por (zm) mostra zona meristemática. Em E e F, calo oriundo do tratamento MS/ESM, seta preta indicada por (pd) mostra formação de protoderme. Em G e H, detalhe da germinação do embrião no tratamento MS/ESM. Em I, detalhe da região distal com visualização dos danos de esmagamento. rd- região distal, rp- região proximal, eo- eófilo 1, b1- bainha 1, b2- bainha 2, pd- protoderme.

Figura 8- Calos formados em (MS/SEC (A, B, C), MS/ESM (D, E, F), COQ/ESM (G, H, I), COQ/ESM (J, K) aos 50 dias de cultivo. Em B, E e K, setas pretas indicadas por (ei) mostram espaços intercelulares, indicadas por (fv), mostram formação de feixes vasculares e indicadas por (pd) mostram formação de protoderme. Em C, F e I, setas pretas indicadas por (xi) indicam formação de elementos traqueais, contendo células características do xilema e (fl) floema. fv- feixe vascular, ei- espaço intercelular, pd- protoderme, xi- protoxilema, fl- protofloema, rd- região distal, eo- eófilo, cc- cavidade cotiledonar, te- tecido remanescente do embrião zigótico.

Experimento 2: Indução de embriogênese somática em embriões zigóticos de coquinho azedo (*Butia capitata*) utilizando 2,4D e Picloram

Figura 1- Calos primários formados aos 15 dias após inoculação. A, B, C: 50 μ M de 2,4D+300 μ M de Picloram; D, E, F: 300 μ M de 2,4D+50 μ M de Picloram; G, H, I: 300 μ M de 2,4D, J, K, L: 300 μ M de Picloram. rd- região distal, rp- região proximal. Seta branca indica centro de multiplicação celular próximo à cavidade cotiledonar. Setas pretas em F

indicam centros meristemáticos. Setas pretas em K indicam os três pontos de formação dos calos.

Figura 2- Calos formados em embriões zigóticos de *B. capitata* aos 45 dias após inoculação. A - 50 μ M de 2,4D+300 μ M de Picloram (calo com aspecto embriogênico); B - 300 μ M de 2,4D+50 μ M de Picloram (calo compacto, não embriogênico); C - 300 μ M de 2,4D (calo compacto, não embriogênico), D - 300 μ M de Picloram (calo com aspecto embriogênico). Seta vermelha indica estruturas globulares organizadas (evidência de tecidos embriogênicos). Barras= 1 mm.

Figura 3- Número de calos aos 15 dias de cultivo (A); Número de calos aos 45 dias de cultivo (A); número de calos com características embriogênicas aos 45 dias de cultivo, caracterizados por apresentar estruturas globulares organizadas e aspecto friável. Letras distintas indicam diferença significativa pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Pic-Picloram.

Figura 4- Conteúdo dos ácidos indolacético (A), abscísico (B) e jasmônico (C) em embriões zigóticos (E), calos não embriogênicos (CN) e embriogênicos (CE) no momento da inoculação e após 45 dias de cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de *B. capitata*.

Figura 5- Aspecto anatômico geral de calos não embriogênicos (A, C) e embriogênicos (B, D, E) após 45 dias de cultivo. Aspecto de possível embrião somático formado (F, G) após 100 dias em cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de *B. capitata*. cpc- cordão procambial; ma-meristema apical; pd-protoderme. As setas pretas não identificadas indicam centros meristemóides.

CAPÍTULO II

Figura 1- Detalhes morfológicos das mudas de coquinho azedo utilizadas como explantes para o cultivo *in vitro*. (A) Muda de coquinho azedo de aproximadamente 50 cm de comprimento, folhas juvenis. (B) Detalhe da região das bainhas das folhas, realização de cortes transversais (discos) próximos à região meristemática apical. (C) Detalhe dos discos transversais retirando-se a parte clorofilada (explante). Barra: 1 mm.

Figura 2- Detalhes dos explantes e calos de *B. capitata* cultivados ao longo de 75 dias. (A) Explante cultivado na dose de 300 μ M de 2,4D aos 30 dias com mais de 50% do tecido do explante oxidado, nota-se início de estrutura deformada na região central do explante (encarquilhamento). (B) Explante encarquilhado cultivado na dose de 100 μ M de 2,4D aos 30 dias. (C) Explante cultivado na dose 300 μ M de 2,4D aos 15 dias, com aumento do volume da região central do explante (encarquilhamento). (D) Explante com calo formado na dose de 400 μ M de 2,4D aos 15 dias. (E) explante com presença de saliências com calos friáveis (setas amarelas) cultivado com 300 μ M de 2,4D aos 30 dias. (F) Superfície do explante contendo calos formados aos 30 dias na dose de 300 μ M de 2,4D. (G e H) Calos aos 75 dias cultivados com 300 e 200 μ M de 2,4D, respectivamente. Notar aspecto mais friável do calo (G) e mais compacto do calo (H). Barras 1 mm.

Figura 3- Número médio de explantes que apresentaram encarquilhamento aos 15, 30,

50 e 75 dias de incubação. Letras iguais nos tratamentos indicam similaridade pelo teste Tukey a 5% de significância. y' =equação transformada; y = equação não transformada. Para fins de interpretação, os valores das médias são originais e o teste foi baseado nos dados transformados. O coeficiente de variação- CV e R^2 foram ajustados com os dados transformados.

Figura 4- Número médio de explantes de folhas de *B. Capitata* com calos aos 15, 30, 50 e 75 dias de incubação. Letras iguais nos tratamentos indicam similaridade pelo teste Tukey a 5% de significância. y' =equação transformada; y = equação não transformada. Para fins de interpretação, os valores das médias são originais e o teste foi baseado nos dados transformados. O coeficiente de variação- CV e R^2 foram ajustados com os dados transformados.

Figura 5- Dispersão gráfica dos dois primeiros componentes principais para as variáveis estudadas no cultivo *in vitro* de explantes de folhas imaturas de *B. Capitata* sob doses de 2,4 D em μM . OXI-15, OXI-30, OXI-50, OXI-75 (número de explantes oxidados aos 15, 30, 50 e 75 dias de cultivo); EC-15, EC-30, EC-50, EC-75 (número de explantes encarquilhados aos 15, 30, 50 e 75 dias de cultivo); NC-15, NC-30, NC-50, NC-75 (número de explantes com presença de calos aos 15, 30, 50 e 75 dias de cultivo).

Figura 6- Matriz de correlação de Pearson para as variáveis estudadas no cultivo *in vitro* de explantes de folhas imaturas de *B. Capitata* sob diferentes doses de 2-4D. OXI-15, OXI-30, OXI-50, OXI-75 (número de explantes oxidados aos 15, 30, 50 e 75 dias de cultivo); EC-15, EC-30, EC-50, EC-75 (número de explantes encarquilhados ou intumescidos aos 15, 30, 50 e 75 dias de cultivo); NC-15, NC-30, NC-50, NC-75 (número de explantes com presença de calos aos 15, 30, 50 e 75 dias de cultivo). Valores marcados com "X" correlação não significativa pelo teste t a 5% de significância, valores não marcados com "X" não são significativos pelo teste t a 5% de significância.

Figura 7- Em A e B detalhes morfológicos e anatômicos dos explantes antes da inoculação *in vitro*. Observar nas setas pretas os feixes vasculares pouco desenvolvidos (folhas jovens). Em C e D, primeiros calos formados na superfície de alguns explantes aos 15 dias de cultivo na dose de 400 μM de 2,4D, a seta laranja indica parte do explante, podendo observar a origem mais epidérmica desses calos. Setas amarelas indicam espaços intercelulares. A seta vermelha indica formação de estrutura semelhante a uma epiderme, notar células pequenas e justapostas. Em E e F, detalhes dos explantes encarquilhados aos 30 dias de cultivo na dose de 100 μM de 2,4D. Observar pequenos centros meristemáticos (setas pretas) e multiplicação celular próximo a feixes vasculares (seta vermelha), que ampliado é possível observar divisões periclinais e anticlinais ao redor dos feixes vasculares com detalhes do protoxilema (px) e protofloema (pf). Observar espaços intercelulares (seta amarela). Em G, H e I, calos formados ao longo de 50 dias de cultivo na dose de 300 μM de 2,4D, sendo perceptível seu crescimento em volta do feixe vascular (setas vermelhas). Observar o colapso das células em volta do calo arredondado e nova epiderme sendo formada (seta preta). Pf- Protofloema, Px- Protoxilema.

Figura 8- Cortes anatômicos dos calos formados após 75 dias de cultivo *in vitro* de explantes de folha de *B. capitata* sob a dose de 300 μM de 2,4-D. (A) Calos formando

aglomerados esféricos e de aspecto friável, semelhantes a pró-embriões somáticos. Em B, C, D, E, mostram cortes anatômicos longitudinais da estrutura apresentada em A, enquanto os cortes F, G e H representam cortes transversais. (B) Estruturas aparentemente isolando-se da estrutura calosa com seta vermelha indicando a conexão da estrutura elipsoide com outras partes do calo, semelhante a um suspensor, enquanto as setas verdes destacam células justapostas que envolvem essas estruturas, sugerindo a formação de uma protoderme. (C) Estruturas redondas isoladas e envoltas por protoderme, indicando desenvolvimento embrionário e vestígios de possível suspensor. (D) Estrutura redonda semelhante a pró-embrião, contendo feixes vasculares em formação (seta preta) e uma zona meristemática (zm- seta vermelha), possivelmente correspondente ao eixo embrionário. (E) Estrutura contendo feixe vascular independente com células características de xilema (xi). (F, G, H) Estruturas semelhantes a pró-embriões em corte transversal apresentando zonas meristemáticas centrais (zm) e envoltório de células em colapso oxidativo. zm- zona meristemática; xi- células características de xilema.

Figura 9- Atividade das enzimas do estresse oxidativo. (A) atividade da catalase (CAT). (B) atividade das peroxidases (POX). (C) atividade da superóxido dismutase (SOD) nos explantes e tecidos cultivados após 50 dias para as doses de 0, 100, 200, 300 e 400 μM de 2,4 D. Letras iguais nos tratamentos indicam similaridade pelo teste Tukey a 5% de significância.

Figura 10- Dispersão gráfica dos dois primeiros Componentes principais (CP) para as variáveis estudadas em relação às diferentes doses de 2,4 D. OXI-50 (número de explantes oxidados aos 50 dias de cultivo); NC-50 (número de explantes com presença de calos aos 50 dias de cultivo); CAT (atividade catalase aos 50 dias de cultivo); POX (atividade peroxidase aos 50 dias de cultivo); SOD (atividade superóxido dismutase aos 50 dias de cultivo).

TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1- Resumo das principais vias regulatórias transcricionais que controlam a indução da embriogênese somática.

Tabela 2- Aspectos morfoanatômicos conhecidos para a identificação de calos embriogênicos e não embriogênicos.

Tabela 3- Principais trabalhos de embriogênese somática em palmeiras publicados nos últimos anos.

CAPÍTULO I

Experimento 1: Efeito do meio e da injúria na indução da embriogênese somática

Tabela 1- Conteúdo de macronutrientes (g/kg de matéria seca) e micronutrientes (mg/kg de matéria seca), presentes no palmito e inflorescência, coletadas em fevereiro de 2022, em plantas de *B. capitata*, provenientes do Banco de Germoplasma do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA/UFMG), Campus Montes Claros, Minas Gerais, Brasil.

Tabela 2- Concentração de íons na solução para a elaboração do meio de cultivo (COQ) para *B. capitata*

Tabela 3- Concentração média de íons para a produção de meio de cultivo de *B. capitata*

Tabela 4- Fonte e concentração de macronutrientes para a produção de meio de cultivo de *B. capitata* (COQ)

Tabela 5- Fonte e concentração de micronutrientes para a produção de meio de cultivo de *B. capitata* (COQ).

Tabela 6- Número de embriões que apresentaram oxidação aparente (OXI), alongamento do pecíolo cotiledonar (PC), presença da parte aérea (PA) e formação de calos com pelo menos uma estrutura globular (CEG) de embriões de *B. capitata*, injuriados (ESM-esmagamento, SEC-seccionamento, AI-ausência de injúria), cultivados em meio MS e COQ e avaliados após 10 e 50 dias após a inoculação (D.A.I).

Tabela 7- Atividade das enzimas catalase e peroxidase, em embriões de *B. capitata*, injuriados (ESM-esmagamento, SEC-seccionamento, AI-ausência de injúria), cultivados em meio MS e COQ e avaliados após 50 dias após a inoculação. Catalase (CAT) $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ mg ptnas}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Peroxidases (POX) $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ mg ptnas}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

CAPÍTULO II

Tabela 1- Composição meio de cultura COQ (Macro e microelementos), aminoácidos e vitaminas utilizados.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	18
2. OBJETIVOS.....	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
3.1 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA: CONCEITOS, APLICAÇÕES E LIMITAÇÕES	20
3.2 APLICAÇÕES DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA	22
3.3 ETAPAS DO PROCESSO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA	22
3.3.1 Indução.....	23
3.3.1.1 Expressão Gênica.....	25
3.3.1.2 Calos e estruturas embriogênicas.....	28
3.3.2 Desenvolvimento e multiplicação.....	29
3.3.3 Maturação de embriões somáticos	30
3.3.4 Regeneração/Germinação	31
3.4 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM PALMEIRAS.....	33
3.4.1 Explantes e meios de cultivo	37
3.5 FITORREGULADORES DE CRESCIMENTO NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE PALMEIRAS.....	38
3.6 INDUÇÃO DE ES EM PALMEIRAS.....	39
3.7 DESENVOLVIMENTO / MULTIPLICAÇÃO	39
3.8 DIFERENCIAÇÃO / MATURAÇÃO	40
3.9 REGENERAÇÃO.....	40
3.10 CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
3.11 REFERÊNCIAS.....	42
4. ARTIGOS.....	52
4.1 CAPÍTULO I: EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA: RESPOSTAS ESTRUTURAIS E FISIOLÓGICAS DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE <i>B. capitata</i> AO MEIO DE CULTIVO, INJÚRIA E REGULADORES DE CRESCIMENTO.....	52
RESUMO	52
ABSTRACT.....	53
4.1.1 INTRODUÇÃO	54
4.1.2 MATERIAL E MÉTODOS	56
Experimento 1: Efeito do meio e da injúria na indução da embriogênese somática ...	56
4.1.2.1 Obtenção dos embriões zigóticos.....	56

4.1.2.2 Meios de cultura	56
4.1.2.3 Instalação e condução do experimento	61
4.1.2.4 Atividade de enzimas do sistema antioxidante	62
4.1.2.4 Avaliação anatômica	62
Experimento 2: Efeito de reguladores de crescimento na indução da embriogênese somática	63
4.1.2.5 Instalação e condução do experimento	63
4.1.2.6 Indução da calogênese e Multiplicação de calos.....	63
4.1.2.7 Perfil Hormonal.....	64
4.1.2.8 Avaliação Anatômica	65
4.1.2.9 Análises estatísticas	65
4.1.3 RESULTADOS	65
Experimento 1: Efeito do meio e da injúria na indução da embriogênese somática ...	65
4.1.3.1 Oxidação, germinação e formação de calos.....	65
4.1.3.2 Morfoanatomia.....	69
4.1.3.3 Após 10 dias de cultivo <i>in vitro</i>	69
4.1.3.4 Após 15 dias de cultivo <i>in vitro</i>	72
4.1.3.5 Após 30 dias de cultivo <i>in vitro</i>	74
4.1.3.6 Após 50 dias de cultivo <i>in vitro</i>	75
Experimento 2: Efeito de reguladores de crescimento na indução da embriogênese somática	77
4.1.4 DISCUSSÃO	85
Experimento 1: Efeito do meio e da injúria na indução da embriogênese somática ...	85
Experimento 2: Efeito de reguladores de crescimento na indução da embriogênese somática	88
4.1.5 CONCLUSÃO	91
4.1.6 REFERÊNCIAS	92
4.2 CAPÍTULO II: 2,4 D NA INDUÇÃO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA UTILIZANDO PLÂNTULAS DE COQUINHÓ AZEDO (<i>Butia capitata</i>).....	102
RESUMO.....	102
ABSTRACT.....	103
4.2.1 INTRODUÇÃO.....	104
4.2.2 MATERIAL E MÉTODOS	106
4.2.2.1 Obtenção das Mudanças	106
4.2.2.2 Inoculação <i>in vitro</i>	107

4.2.2.3	Análise de enzimas do estresse oxidativo	109
4.2.2.4	Avaliação anatômica	109
4.2.2.5	Análises estatísticas	109
4.2.3	RESULTADOS	110
4.2.3.1	Enzimas do Estresse Oxidativo	120
4.2.4	DISCUSSÃO	123
4.2.4.1	Respostas morfológicas ao 2,4-D.....	123
4.2.4.2	Anatomia e sistema antioxidante.....	125
4.2.4.3	Enzimas do Estresse Oxidativo	126
4.2.5	CONCLUSÃO	127
4.2.6	REFERÊNCIAS	129

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil possui elevada biodiversidade vegetal, na qual há espécies ainda desconhecidas ou subexploradas (LORENZI *et al.*, 2010). A família *Arecaceae*, considerada uma das mais importantes, apresenta 300 espécies nativas do Brasil, muitas das quais com evidente potencial econômico e inseridas nos mais variados biomas (LORENZI *et al.*, 2010; RODRIGUES, 2023). O coquinho-azedo (*Butia capitata*), uma palmeira endêmica do Cerrado, encontrada nos estados da Bahia, Goiás e Minas Gerais, é uma dessas espécies. Seus frutos possuem elevado valor nutricional e são utilizados pelas comunidades locais na produção de sucos, sorvetes, picolés e outros alimentos, gerando renda e valorizando a flora nativa brasileira (FARIA *et al.*, 2008; LEITMAN *et al.*, 2013). No entanto a exploração extrativista da espécie, somada aos impactos da expansão da fronteira agrícola no Cerrado, colocou-a na lista de plantas ameaçadas (SILVA e SCARIOT, 2013; SIBBR, 2020).

O melhoramento genético e a domesticação de *B. capitata* podem contribuir para minimizar os efeitos de atividades antrópicas, além de fornecer subsídios para o desenvolvimento de técnicas de manejo com o objetivo de aumentar a produtividade da cultura e, assim, conservar recursos genéticos valiosos (SÁ, 2023). Contudo o melhoramento genético de espécies perenes é dispendioso em tempo e recursos (BORÉM; MIRANDA, 2017). À vista disso, a cultura de células e tecidos vegetais constitui uma ferramenta promissora, para a propagação clonal de matrizes superiores, o que facilita os programas de melhoramento genético e, conseqüentemente, contribui para a domesticação (PAIS, 2019; GUAN *et al.*, 2016).

A embriogênese somática (ES) se destaca como possibilidade de propagação clonal para palmeiras. Esse método consiste na obtenção de embriões na ausência de fertilização, denominados embriões somáticos. Células somáticas desenvolvem-se, por meio de estímulos apropriados, originando um indivíduo clonal a partir daquele que forneceu o explante (HORSTMAN *et al.*, 2017; KUMAR e VAN STADEN, 2017). O processo de embriogênese somática envolve as etapas de indução, desenvolvimento/multiplicação, diferenciação/maturação e regeneração. No entanto observa-se que não se trata de um processo linear, mas, sim, um processo assíncrono e influenciado por diversos fatores morfológicos, fisiológicos e genéticos que afetam todas as etapas (MEIRA *et al.*, 2020; DE CAMPOS *et al.*, 2020; SILVA-CARDOSO, 2022). Entre os fatores mais significativos, destacam-se a idade fisiológica e o tipo de

explante (BARBARA *et al.*, 2018; DU *et al.*, 2020). Explantes originários de tecidos meristemáticos, quando induzidos, apresentam maior competência embriogênica que aqueles provenientes de tecidos lignificados, ou seja, apresentam maior capacidade de responder a estímulos indutivos e adquirir a habilidade de formar embriões somáticos (SILVA-CARDOSO *et al.*, 2022). Do mesmo modo, os componentes do meio de cultivo são fatores bastante relevantes para o sucesso da indução da embriogênese somática (GULZAR *et al.*, 2020). Nesse sentido, posto que são vários os fatores que influenciam o processo de ES, tem sido recomendado o uso de embriões zigóticos em espécies que ainda se encontram em fase de estudos iniciais (DU *et al.*, 2020).

A indução representa o início de um caminho específico de desenvolvimento, originando células e tecidos determinados para diferentes rotas morfogênicas (CHRISTIANSON; WARNICK, 1983). Nessa fase, alguns genes são ativados por aplicação de fitorreguladores exógenos ou alguma fonte de estresse, culminando na formação de células determinadas para embriogênese (NAMASIVAYAM *et al.*, 2007; ELHITI *et al.*, 2013; AGUILAR-HERNÁNDEZ, 2018). O uso de auxinas sintéticas, como o 2,4-D, tem se mostrado fundamental nesse processo, atuando como promotor da aquisição de competência embriogênica, favorecendo a formação de calos com elevado potencial morfogênico (FEHÉR *et al.*, 2003; WÓJCIK *et al.*, 2020). Aliado a isso, estímulos de estresse físico ou químico, como injúrias mecânicas, variações de temperatura e choques osmóticos, também desencadeiam respostas celulares que ativam vias de reprogramação gênica, estimulando a proliferação de calos e tecidos embriogênicos (IWASE *et al.*, 2011; KUMAR; VAN STADEN, 2017).

A possibilidade de desenvolver materiais clonais superiores de *B. capitata*, a serem incorporados pelos produtores em pomares comerciais, poderá contribuir para o aumento da renda e a valorização das cadeias produtivas locais (BENIN *et al.*, 2003). Nesse contexto, a embriogênese somática apresenta-se como uma ferramenta promissora para a espécie e outras palmeiras nativas similares (LUIS e SCHERWINSKI-PEREIRA, 2014). Entretanto, para desenvolver esse tipo de propagação vegetativa, é fundamental compreender os eventos iniciais da embriogênese somática e os fatores envolvidos no processo, principalmente, em espécies pouco estudadas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os eventos iniciais e os fatores determinantes na indução da embriogênese somática em embriões zigóticos e folhas imaturas de *Butia capitata* (coquinho-azedo).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a formação de calos com potencial embriogênico de embriões zigóticos submetidos a diferentes injúrias mecânicas, meios de cultivo e reguladores de crescimento;
- Avaliar as respostas calogênicas e o potencial embriogênico de tecidos de folhas imaturas submetidos a diferentes doses de 2,4-D
- Caracterizar aspectos morfofisiológicos da indução de embriogênese somática em *B. capitata*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA: CONCEITOS, APLICAÇÕES E LIMITAÇÕES

A cultura de células e tecidos vegetais envolve um conjunto de metodologias destinadas ao cultivo de células ou segmentos de órgãos vegetais (explantes) em meios de cultivo estéreis e sob condições de crescimento controladas (MARISOL OCHOA-VILLARREAL *et al.*, 2016). Uma das principais aplicações dessa técnica é a regeneração *in vitro* de plantas via organogênese ou embriogênese somática (direta ou indireta) (HORSTMAN *et al.*, 2017). A regeneração de uma nova planta, a partir do cultivo celular do explante doador, baseia-se no princípio da totipotência celular (FISHER *et al.*, 2019). Esse princípio considera que qualquer célula somática possui informação genética suficiente para originar uma planta completa e saudável (HORSTMAN *et al.*, 2017; FISHER *et al.*, 2019).

A morfogênese *in vitro* pode ser desencadeada por duas rotas distintas: organogênese ou embriogênese somática. A organogênese consiste na formação de órgãos (raízes, gemas, brotações), a partir de um explante, constituindo-se em um processo unipolar (LIU *et al.*, 2018). Por outro lado, a embriogênese somática (ES)

proporciona a formação de embriões na ausência de fertilização. Dessa forma, os embriões somáticos, por meio de estímulos apropriados, germinam e originam um indivíduo clonal daquele que forneceu o explante, constituindo-se um processo bipolar (HORSTMAN *et al.*, 2017; SILVA-CARDOSO *et al.*, 2022). A ES apresenta maior eficiência de multiplicação do que a organogênese, sendo mais vantajosa para a propagação *in vitro* de espécies lenhosas ou de remotas possibilidades de propagação vegetativa (MAZRI *et al.*, 2017).

A embriogênese somática pode ocorrer pela via direta (sem a formação de calos-estruturas celulares amorfas) ou indireta (com a formação de calos). A embriogênese somática direta (ESD) é caracterizada pela formação de embriões somáticos na própria superfície do explante (HORSTMAN *et al.*, 2017; KUMAR e VAN STADEN, 2017). Nesse caso, o processo de desdiferenciação celular, caracterizado pela transição de um estado celular mais diferenciado para outro menos diferenciado, seguido da diferenciação em embriões somáticos, ocorre diretamente, sem a etapa intermediária de formação de calos. Ainda, a ESD é mais comumente observada no cultivo *in vitro* de embriões zigóticos (DUCROCQ *et al.* 1994; CHOI *et al.*, 1998; D.GAJ *et al.*, 2001). Portanto acredita-se que tecidos embrionários oriundos de embriões zigóticos apresentam competência embriogênica pré-determinada, por isso, são mais responsivos ao processo de embriogênese somática (WILLIAMS e MAHESWARAN, 1986).

Na embriogênese somática indireta (ESI), formam-se tecidos amorfos, com intensa atividade meristemática (calos), que podem ou não adquirir competência embriogênica. Nesse processo, a formação do embrião depende de uma complexa regulação das diferentes etapas do desenvolvimento embriogênico, exigindo uma reprogramação genética robusta (HORSTMAN *et al.*, 2017; KUMAR e VAN STADEN, 2017). A ESI pode ser vantajosa por possibilitar, a partir de um único explante, a obtenção de um maior número de plântulas, bem como de permitir maior controle das fases do processo embriogênico, uma vez que possibilita a criopreservação dos materiais em diferentes estágios de desenvolvimento (SIVANESAN *et al.*, 2022). Além disso, é possível que os cultivos celulares sejam subcultivados; no entanto esse processo deve ser limitado, em função do risco de ocorrência de variações somaclonais, resultantes do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas (GARCIA *et al.*, 2019).

3.2 APLICAÇÕES DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

Considerando o amplo conhecimento teórico sobre os processos e mecanismos da embriogênese somática (ES), em plantas-modelo como a *Arabidopsis*, sua aplicação *in vitro* ainda é limitada, em virtude da baixa capacidade de resposta apresentada por muitas espécies e cultivares, principalmente, em plantas lenhosas (KADOKURA *et al.*, 2018; WOJCIK *et al.*, 2018). Assim, entre as principais aplicações da ES, a propagação clonal é uma das mais significativas, especialmente, para espécies monocotiledôneas perenes com escassas alternativas de propagação clonal, como é comum em palmeiras (CARVALHO *et al.*, 2006; MAZRI *et al.*, 2017).

A clonagem também representa uma estratégia de elevado potencial para apoiar programas de melhoramento genético e conservação de germoplasma, bem como para subsidiar o criarmazenamento de materiais genéticos e a transformação genética, incluindo a edição de genes. Além disso, possibilita, por meio de subcultivos, a produção de mudas em larga escala, com alto vigor e isentas de problemas fitossanitários, tornando mais seguro o trânsito de mudas e a implantação de lavouras mais rentáveis e sustentáveis (PAIS, 2019; GUAN *et al.*, 2016). De modo adicional, o conhecimento sobre cultivo *in vitro* pode ser útil no estudo de fatores nutricionais. As condições controladas de cultivo de células e tecidos vegetais permitem determinar, com maior exatidão, a influência do estresse biótico e abiótico sobre o metabolismo secundário, auxiliando em programas de adubação e manejo da espécie (SCHILLBERG *et al.*, 2013; NAUSCH e BUYEL, 2021).

3.3 ETAPAS DO PROCESSO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

De maneira simplificada, o processo de embriogênese somática pode ser subdividido em quatro etapas: 1) indução, 2) desenvolvimento/multiplicação, 3) diferenciação/maturação e 4) regeneração. No caso de espécies sem informações prévias sobre a embriogênese somática, a etapa de indução torna-se crucial para o sucesso dessa ferramenta biotecnológica. Mesmo com a disposição didática dessas fases, verifica-se que não se trata de um processo linear, mas, sim, assíncrono e influenciado por diversos fatores morfológicos, fisiológicos, genéticos e epigenéticos, os quais afetam todo o processo (MEIRA *et al.*, 2020; DE CAMPOS *et al.*, 2020; SILVA-CARDOSO, 2022).

As etapas esquematizadas do processo básico de embriogênese somática indireta *in vitro*, utilizando reguladores de crescimento e agentes osmóticos, são apresentadas na Figura 1. Neste exemplo, utilizou-se a auxina indutora 2,4-D como modelo.

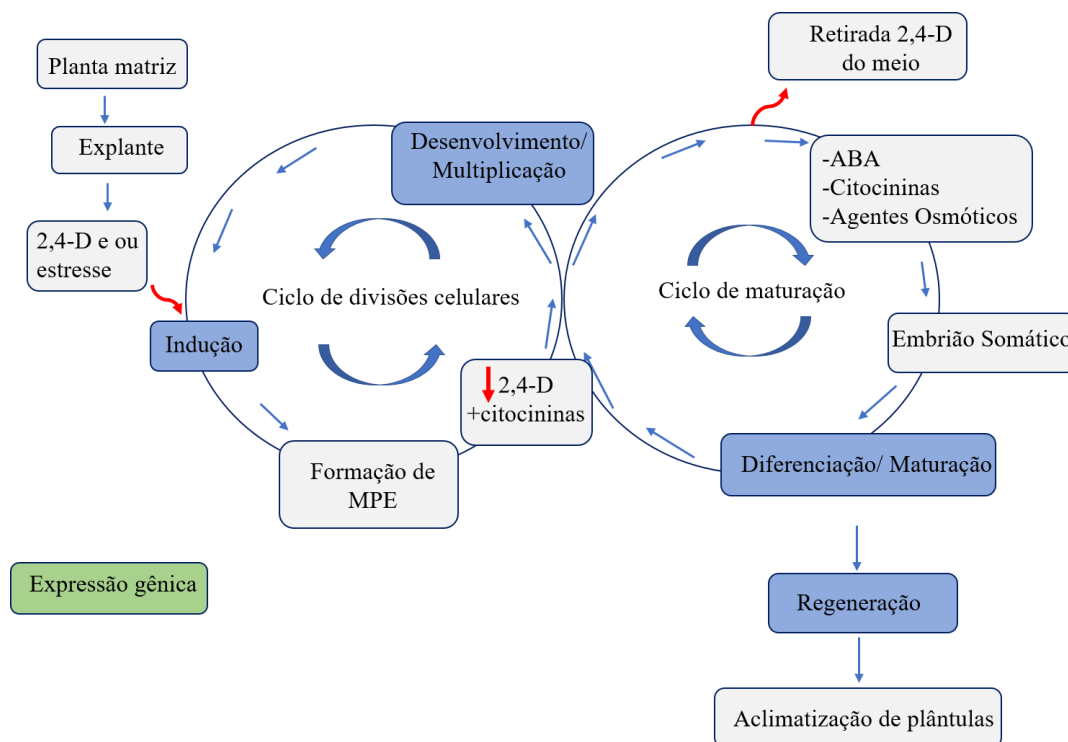


Figura 1- Esquema da embriogênese somática indireta com a utilização da auxina (2,4D). Adaptado de STEINER, 2008. Nota: 2,4D: 2,4 diclorofenoxiacético; MPE: massas pró-embriogênicas; ABA: ácido abscísico.

3.3.1 Indução

A indução representa o início de um caminho específico de desenvolvimento, dando origem a células e tecidos determinados para diferentes rotas morfogênicas (CHRISTIANSON; WARNICK, 1983). Nessa fase, alguns genes são ativados pela aplicação de fitoreguladores exógenos ou alguma outra fonte de estresse, promovendo a formação de células determinadas para embriogênese. Esse processo é dividido em três etapas principais: desdiferenciação, aquisição de competência e determinação celular (NAMASIVAYAM *et al.*, 2007; ELHITI *et al.*, 2013).

A totipotência nos tecidos vegetais se manifesta com a desdiferenciação celular, essencial para que as células readquiram a capacidade meristemática e possam originar

diversos tipos celulares, incluindo células embriogênicas (FEHÉR, 2015). Uma vez desdiferenciadas, essas células, quando expostas a sinais específicos, tornam-se competentes para iniciar o processo de embriogênese somática. A determinação marca o fim do processo de indução, no qual a combinação de fatores internos e externos, como fitorreguladores e outros componentes do meio, direcionam a formação de tecidos específicos do embrião (WU *et al.*, 2015; FEHÉR, 2015).

No primeiro ciclo (Figura 1), o explante da planta matriz é inoculado em meios de cultura contendo fitorregulador ou outro estímulo de estresse associado, promovendo a ativação de genes envolvidos no processo de indução. A auxina 2,4 diclorofenoxiacético (2,4D) é a mais utilizada como auxina indutora de ES, sendo verificada na maioria (78%) dos 80 protocolos investigados de embriogênese somática para diversas espécies (WÓJCIK *et al.* 2020). Esse fitorregulador promove efeito duplo importante: ao mesmo tempo que desencadeia a produção de ácido indol-3-acético (AIA) endógeno, é também um importante indutor de estresse celular, modulando a reprogramação das células via metilação do DNA nuclear. O 2,4D desempenha papel fundamental nos processos de crescimento e morfogênese das plantas, de maneira especial, controlando a aquisição de competência embrionária (FEHÉR *et al.*, 2003, MIRONOVA *et al.*, 2017). Tais efeitos são fundamentais para permitir a transição somática para embriogênica (FÉHER *et al.*, 2003; WÓJCIK *et al.* 2020; GARCIA *et al.*, 2022).

A indução envolve diversos fenômenos tais como sinalização em nível celular, alterações na composição da parede celular e mudanças hormonais e epigenéticas, que podem ter origem unicelular ou multicelular. A embriogênese somática indireta (ESI) é caracterizada pela desdiferenciação celular, com elevada atividade meristemática e formação de calos (MAGNANI *et al.*, 2017; MÉNDEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2019). Os explantes, ao serem induzidos, formam calos que evoluem para massas celulares pró-embriogênicas (MPE) ou embriões globulares no estágio pré-embriônico. Essas MPE são ainda capazes de originar embriões secundários por meio de ciclos repetidos de divisão celular (GUERRA *et al.*, 1999). Assim, os meios de indução de ES iniciam o processo de desdiferenciação celular que, no caso da via indireta, é evidenciado pela intensa atividade mitótica e formação de calos (MAGNANI *et al.*, 2017; MÉNDEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2019). Esses calos podem evoluir para massas pró-embriogênicas e, posteriormente, para embriões somáticos (SIVILAY *et al.*, 2024).

A indução e todo o processo de ES são influenciados por múltiplos fatores, incluindo o genótipo do explante, tipo e idade fisiológica do tecido, e, também, por

aspectos hormonais e epigenéticos (VARIS *et al.*, 2018; HAPSORO *et al.*, 2020). Entre esses fatores, destacam-se a idade fisiológica e tipo de explante (BARBARA *et al.*, 2018; DU *et al.*, 2020). Portanto explantes originários de tecidos meristemáticos, quando induzidos, apresentam maior competência embriogênica do que aqueles originários de tecidos lignificados (SILVA-CARDOSO *et al.*, 2022).

Em espécies consideradas altamente recalcitrantes à ES ou que estão na fase inicial de estudo, embriões zigóticos têm sido adotados como explantes modelo (DU *et al.*, 2020). O uso desses embriões oferece diversas vantagens: utilização em larga escala, uniformidade, facilidade de coleta, transporte em longas distâncias e menor risco de contaminação (TEIXEIRA *et al.*, 1993). Além disso, em programas de melhoramento genético, a clonagem de embriões zigóticos é de grande importância, em virtude da sua capacidade de acelerar os ciclos de seleção, principalmente, em gerações de retrocruzamentos, em que cada semente/embrião representa um único genótipo. Logo a capacidade de reproduzir cada genótipo por clonagem permite uma avaliação mais eficaz através da replicação em experimentos de campo (BALZON *et al.*, 2013).

Outras formas de indução, associadas ou não à aplicação de fitorreguladores, têm sido exploradas, em especial, relacionadas ao estresse *in vitro*, como: radiação ultravioleta, íons de metais pesados, choques osmóticos, desidratação, choques de alta e baixa temperatura e antibióticos, além de indução química e mecânica (ZAVATTIERI *et al.* 2010; GARCIA *et al.* 2019; HOLOBIUC, 2015). Em *Arabidopsis* tipo B (ARR), o fator de transcrição WOUND INDUCED DEDIFFERENTIATION 1 (WIND1) e seus homólogos foram identificados como ativadores da desdiferenciação celular e proliferação de calos após ferimentos e ruptura dos tecidos (IWASE *et al.*, 2011). Por conseguinte, o estresse *in vitro* se destaca como um dos principais moduladores da reprogramação genética que permite a transição do estado somático para embrionário (KUMAR e VAN STADEN, 2017).

3.3.1.1 Expressão Gênica

Como anteriormente mencionado, a indução da embriogênese somática (ES) compreende a aquisição de competência embriogênica. A competência embriogênica não garante, por si só, o sucesso da ES, porém é um dos fatores mais importantes. A formação bem-sucedida do embrião somático, até a regeneração da plântula, requer a atuação simultânea de mecanismos de sinalização genética e a expressão adequada de genes específicos (GULZAR *et al.*, 2020). Portanto todos os fatores que influenciam a

ES desempenham papéis na sinalização genética e epigenética, o que evidencia a complexidade de controlar todos os efeitos envolvidos a fim de alcançar o sucesso do processo.

Independentemente da relevância de todos os grupos de genes envolvidos na expressão da ES, destacam-se aqueles associados ao metabolismo hormonal, pois são considerados fortes iniciadores do processo (SMERTENKO *et al.*, 2014). Destarte, nesta revisão, serão apresentados os principais fatores de expressão gênica relacionados ao metabolismo hormonal que desencadeia o processo de ES. O uso de fitorreguladores exógenos, sobretudo auxinas, associados ou não a fatores de estresse, promove a ativação dos componentes da via de sinalização da auxina (VAN STADEN, 2017; WÓJCIK *et al.*, 2020). A tabela a seguir resume os principais genes e fatores de transcrição envolvidos na indução da ES.

Tabela 1- Resumo das principais vias regulatórias transcricionais que controlam a indução da embriogênese somática.

Principais Componentes da via de sinalização de auxina na indução de ES	Função
<i>Complexo SKP/CULLIN/F-BOX-ubiquitina (SCF TIR1)</i>	Compreende diversas proteínas, como os receptores de auxina (TAARs). Os TAARs direcionam os membros da família de proteínas repressoras transcricionais AUX/IAA para uma degradação dependente do proteassoma (LEYSER, 2018).
<i>Correguladores transcricionais Aux/IAA.</i>	A degradação dos correguladores transcricionais AUX/IAA culmina na liberação do correpressor transcricional TOPLESS (TPL) e permite que as proteínas (<i>Fator de Resposta à Auxina- (ARFs)</i>) se liguem aos promotores dos genes primários responsivos à auxina e, assim, regular sua transcrição (LEYSER, 2018).
<i>Proteínas de ligação específicas de sequência (Fator de Resposta à Auxina- (ARFs)</i>	Os ARFs promovem reprogramação genética das células somáticas do explante, que modula as transições para cada um dos estágios do desenvolvimento embrionário somático (VAN STADEN, 2017). Os perfis de expressão tanto dos genes AUX/IAA quanto dos ARFs são altamente diversos, refletindo a complexidade da regulação transcricional desses genes, que são ajustados por vários fatores, incluindo o status hormonal de um tecido (LI, 2016; WÓJCIK <i>et al</i> 2020).
<i>Genes do TAA1/YUC</i>	Controlam a via de biossíntese de auxina endógena, associada à aquisição de competência embriogênica, ou seja, a transição do estágio somático para embriogênico (KUMAR e VAN STADEN 2017).

<p><i>Genes do cotilédone frondoso (LEC1 e LEC2).</i></p>	<p>Genes são expressos, após desdiferenciação e aumentam o nível de auxina endógena, que, em consequência, regula positivamente a expressão dos genes Curly Leaf (CLF), Wuschel (WUS) e Somatic Embryogenesis Receptor Kinase (SERK) (KUMAR e VAN STADEN 2017).</p>
<p><i>Curly Leaf (CLF), Wuschel (WUS) e Somatic Embryogenesis Receptor Kinase (SERK).</i></p>	<p>Genes diretamente relacionados com a expressão da totipotência celular (KUMAR e VAN STADEN 2017; SIVANESAN <i>et al.</i>, 2022).</p>
<p><i>Transportadores de auxinas (Genes PINs)</i></p>	<p>Controlam o transporte de auxina polar, durante o desenvolvimento <i>in vitro</i>, com respostas diferentes em auxinas naturais e sintéticas (KROGAN <i>et al.</i>, 2016). Enquanto a auxina natural IAA é transportada polarmente pelos transportadores de auxina (proteínas de efluxo- PIN-FORMED (PIN) e P- GLYCOPROTEIN (PGP); proteínas de influxo-AUXIN1/LIKE-AUX1 (AUX/LAX), o transporte de 2,4-D pelos portadores de efluxo PIN é limitado, resultando em um acúmulo de 2,4-D nas células vegetais (DE RYBEL 2009).</p>

É fato que a dose de auxina que induz a expressão dos genes varia de espécie para espécie. Acredita-se, inicialmente, que as auxinas exógenas alteram os níveis de metilação do DNA em células embriogênicas e que um nível ótimo de metilação é necessário para o desenvolvimento normal do embrião somático. Nesse contexto, tanto a hipometilação quanto a hipermetilação parecem ser igualmente inibitórias quando utilizadas no processo de embriogênese somática (GARCIA *et al.*, 2019). Além da biossíntese de auxina endógena, desencadeada pela aplicação exógena deste regulador, outros aspectos como a percepção da auxina, o transporte polar e a sinalização/resposta também estão envolvidos no mecanismo de indução da ES (WÓJCIK *et al.*, 2020).

Outros fitormônios também foram identificados como auxiliares na aquisição da competência embriogênica. A sinalização do ácido abscísico (ABA) foi confirmada como vital, atuando como um fator de estresse durante a indução do embrião somático (FEHÉR, 2015). O etileno, induzido pelo uso de 2,4-D, atua, sobretudo, em conjunto com o ácido jasmônico (JA), o ácido salicílico (SA) e o próprio ABA, para regular diversos processos biológicos, incluindo estresse oxidativo, hipóxia e morte celular programada (WANG *et al.*, 2002). Nesse sentido, o etileno é um fitormônio crucial, durante a iniciação

e o desenvolvimento da ES, embora seu acúmulo no ambiente *in vitro* possa ter efeitos negativos sobre o desenvolvimento embrionário (VIKRANT, 2018; GARCIA *et al.*, 2022).

3.3.1.2 Calos e estruturas embriogênicas

De forma geral, os calos embriogênicos formados na fase de indução, mediada por fitorreguladores de crescimento e/ou diferentes tipos de estresse, proliferam e originam massas pró-embriogênicas (HALPERIN, 1966; YANG e ZHANG, 2010). Portanto estudos histológicos também são importantes, para a compreensão dos processos de embriogênese somática, uma vez que permitem diferenciar calos embriogênicos de não embriogênicos, além de descrever a estrutura dos embriões somáticos (ZHANG *et al.*, 2021).

A tabela a seguir apresenta os principais aspectos morfoanatômicos conhecidos para a identificação de calos embriogênicos.

Tabela 2- Aspectos morfoanatômicos conhecidos para a identificação de calos embriogênicos e não embriogênicos.

	Aspectos Morfológicos	Aspectos Anatômicos	Aspectos Histoquímicos
Calos Embriogênicos	Calos friáveis e de coloração clara e amarelo-acastanhados (MAZRI <i>et al.</i> , 2018; MEIRA <i>et al.</i> , 2020; ZHANG <i>et al.</i> , 2021; DU <i>et al.</i> , 2020). Presença de aglomerados arredondados de diferentes tamanhos (ZEIN EL DIN, 2021).	Centros meristemáticos são uma característica marcante de calos embriogênicos, indicando resposta à aplicação de fitorreguladores ao meio de cultivo (QUIROZ <i>et al.</i> , 2006; FEHÉR <i>et al.</i> , 2015). Em geral, as células são pequenas, isodiamétricas e agregadas, com alta relação núcleo/citoplasma. Apresentam poucos e pequenos vacúolos, organelas abundantes e paredes celulares espessas (BALZON <i>et al.</i> , 2013; SILVA- CARDOSO <i>et al.</i> 2019b; DE CAMPOS <i>et al.</i> , 2020).	Presença de pequenos grãos de amido e proteínas nas células meristemáticas e embriogênicas. Compostos fenólicos nas células também é um indicativo de resposta embriogênica, sugerindo que as células estão respondendo ao estímulo hormonal (QUIROZ <i>et al.</i> , 2006; FEHÉR <i>et al.</i> , 2015).

<p style="text-align: center;">Calos não Embriogênicos</p>	<p>Calos macios e leitosos com formato irregular (ZHANG <i>et al.</i>, 2021).</p>	<p>Células maiores, alongadas, presença de espaços intercelulares e citoplasma pouco denso (NA, 2007; DU <i>et al.</i>, 2020; ZHANG <i>et al.</i>, 2021). Células com diferentes tamanhos, altamente vacuoladas, contendo poucas organelas que podem ser interpretadas como sinais de baixa atividade metabólica (YANG e ZHANG 2010).</p>	<p>Coram-se com <i>Evans blue</i>, indicando permeabilidade e início de morte celular (CIPRIANO, 2018). Declínio nas reservas proteicas caracterizadas pelo aumento da floculação de corpos protéicos e consequente formação de vacúolos (SILVA-CARDOSO <i>et al.</i>, 2019b).</p>
---	---	---	--

3.3.2 Desenvolvimento e multiplicação

A partir da indução e obtenção de calos com competência embriogênica, é necessário que ocorra a rediferenciação celular por meio da reprogramação genética. Isso geralmente ocorre em associação com a retirada parcial da auxina indutora do meio de cultivo (Figura 1), permitindo que o embrião somático se desenvolva e se multiplique (MAHDAVI-DARVARI *et al.*, 2015), posto que a auxina, em doses elevadas, impede o desenvolvimento normal do embrião (ZHANG *et al.*, 2021). Além da redução da auxina, a adição de citocininas tem sido apontada como um fator primordial, para a manutenção da multiplicação de linhagens embriogênicas (GRANJA *et al.*, 2018; FERREIRA *et al.*, 2022a; SILVA-CARDOSO, 2022), favorecendo a multiplicação do tecido embriogênico. De tal modo, o sucesso de um protocolo de embriogênese somática depende tanto da eficácia na indução de calos quanto da capacidade de multiplicar as linhagens embriogênicas (GRANJA *et al.*, 2018).

A presença da auxina, especificamente do 2,4-D, está relacionada também à polaridade celular e à divisão celular assimétrica, o que influencia alterações na morfologia celular, fisiologia, metabolismo e expressão gênica. Logo a bipolaridade do embrião evidencia normalidade do desenvolvimento do embrião somático (GARCIA *et al.*, 2019). A formação do embrião somático normal é essencial para a maturação e germinação adequada das plântulas. Os efeitos genéticos relacionados à metilação do DNA nuclear estão associados ao desenvolvimento embrionário somático *in vitro*. Embriões somáticos anormais de cacaueiro apresentam uma alta proporção de células anucleadas, presença de vacúolos líticos e maior número de vesículas (GARCIA *et al.*, 2022).

Em embriões anormais, os genes ligados ao transporte de auxinas (proteínas PIN) apresentaram um padrão de metilação que bloqueia esse transporte, comprometendo a disposição bipolar do crescimento embrionário. O transporte de 2,4-D pelos transportadores de efluxo PIN é limitado, quando comparado ao transporte de AIA nas células, o que resulta em acúmulo de 2,4-D nos tecidos vegetais (RYBEL *et al.*, 2009). Essas informações permitem inferir que os embriões anormais se originam, sobretudo, do acúmulo excessivo de 2,4-D nas células. A anormalidade dos embriões pode estar diretamente relacionada também ao ambiente de hipóxia, associado à expressão de genes que codificam o etileno e seu precursor ACC, cuja produção é estimulada pela adição de 2,4-D (GARCIA *et al.*, 2022). Portanto o acúmulo excessivo de etileno no ambiente *in vitro* é prejudicial ao desenvolvimento normal do embrião.

Não obstante esteja evidente que é importante reduzir os níveis de auxinas indutoras nos subcultivos de calos embriogênicos, a fim de permitir o desenvolvimento dos embriões, ainda não há um consenso sobre a melhor forma de realizar essa redução. Existem estudos que apontam respostas favoráveis à redução drástica (BALZAN *et al.*, 2013; DE CAMPOS *et al.*, 2020), enquanto outros indicam que a redução gradual pode ser mais eficaz (SILVA-CARDOSO *et al.*, 2019a).

3.3.3 Maturação de embriões somáticos

No segundo ciclo (Figura 1), os pró-embriões podem ser estimulados a completar seu desenvolvimento, o qual é caracterizado pela identificação dos polos apical e radicular, delimitação dos embriões por epiderme e formação de feixes vasculares (HORSTMAN *et al.*, 2017; DU *et al.*, 2020). Além disso, ocorre acúmulo de reservas, principalmente amido, necessárias para a regeneração das plântulas (SILVA-CARDOSO *et al.*, 2019; DE CAMPOS *et al.*, 2020; CARDOSO *et al.*, 2020; BALZON, *et al.*, 2013). A limitação da dessecação do embrião no cultivo *in vitro* é apontada como um dos principais fatores que resultam em baixas taxas de recuperação das plantas (MUHEDANER *et al.* 2019), a qual está relacionada à elevada umidade relativa do ambiente *in vitro*.

A maturação do embrião, via de regra, é realizada com a retirada total da auxina indutora (Figura 1), uso de citocininas e ou combinação de agentes que promovam estresse osmótico (FERREIRA *et al.*, 2022a; VALE *et al.*, 2018). Outras alternativas têm sido investigadas, apresentam resultados positivos para dessecação e maturação dos

embriões somáticos, como: o uso de papel filtro no meio de cultura (MUHEDANER *et al.* 2019; REMAKANTHAN *et al.*, 2014); pré-cultura sem reguladores de crescimento vegetal antes da maturação (OLARIETA *et al.*, 2023) e o uso de carvão ativado (BANDUPRIYA *et al.*, 2016). Essas estratégias visam simular condições fisiológicas semelhantes às encontradas nas sementes, favorecendo a maturação eficiente dos embriões somáticos e aumentando as taxas de conversão em plântulas.

3.3.4 Regeneração/Germinação

O processo de germinação de embriões somáticos é semelhante ao processo de germinação de embriões zigóticos, conforme descrito por FERREIRA *et al.* (2020). No entanto diversos autores apontam a conversão de embriões somáticos em plantas como outro gargalo da embriogênese somática, especialmente em palmeiras (SILVA-CARDOSO *et al.*, 2022; DE CAMPOS *et al.*, 2020). A germinação e conversão dos embriões em plântulas depende, inicialmente, da formação de embriões normais e capazes de responder aos estímulos do meio. Na maioria das espécies lenhosas, a percentagem de formação de embriões normais é baixa. Estudo com o cacauzeiro mostrou que apenas 18,64% dos embriões somáticos eram do tipo normal, enquanto os demais 81,36% apresentavam alguma anomalia grave, o que impedia pelo menos 95% desses de germinarem (GARCIA *et al.*, 2022). De maneira semelhante, em *Syagrus oleracea*, os embriões somáticos praticamente não resultaram em plântulas normais, resultado da ocorrência de fusão e germinação precoce (SILVA-CARDOSO *et al.*, 2022).

Entre os fatores que afetam o desenvolvimento de embriões somáticos e impedem a regeneração de plantas saudáveis destaca-se o ambiente *in vitro*, que, por si só, favorece a ocorrência de uma série de agentes estressores, como: elevada concentração de sais, desequilíbrio osmótico, alta umidade relativa, ferimentos, entre outros. Além disso, a exposição, por longos períodos de cultivo, a fitoreguladores de crescimento em altas concentrações também tem sido relacionada à ocorrência de embriões somáticos de baixa qualidade, geralmente com anormalidades evidentes (SUN *et al.*, 2010; PRUDENTE *et al.*, 2019; SILVA-CARDOSO *et al.*, 2019^{a, b}).

Reservas de amido e proteínas também têm sido apontadas como fundamentais no sucesso da regeneração de embriões somáticos, uma vez que embriões com maiores quantidades dessas reservas apresentam maior capacidade de germinação (SILVA-CARDOSO *et al.*, 2019; AL-KHAYRI e AL-BAHRANY, 2012). Já foi identificado que o

ambiente escuro favorece o acúmulo de reservas nos embriões somáticos (ADERKAS et al., 2015). No entanto a luz é essencial para sua germinação (ASLAM et al., 2008; GOW et al., 2009; DU et al., 2020).

Da mesma maneira, a fonte de energia é fundamental, para o sucesso da germinação *in vitro*, uma vez que, ao contrário do que ocorre nas sementes botânicas, os embriões não têm acesso ao endosperma. Por constituir o principal produto encontrado na seiva do floema da maioria das plantas, a sacarose é a principal fonte de carbono utilizada em cultura de tecidos (DU et al., 2020). A sacarose exerce um duplo efeito no cultivo *in vitro*: atua como fonte de energia e ainda como regulador osmótico. Contudo, quando submetida à autoclavagem, parte da sacarose transforma-se em derivados furânicos (MOHAMED et al., 2021), compostos que podem ser inibitórios ao crescimento vegetal, causando danos na cromatina e no DNA (ALMEIDA et al., 2009). Nesse sentido, OLARIETA et al., (2023) identificaram a necessidade de redução do teor de sacarose para germinação satisfatória de pinheiro radiata. Alguns autores têm estudado outras fontes de carboidratos, como glicose, lactose, maltose e sorbitol, sendo que a eficiência de cada fonte depende da espécie cultivada (CASTRO et al., 2010). De modo geral, altas concentrações de sacarose podem levar à diminuição da absorção de água e minerais, o que, por sua vez, pode interferir no crescimento das plantas (BESSON et al., 2010).

A aclimatização (Figura 1) consiste na transição gradual das plântulas do ambiente controlado de cultivo para condições *ex vitro*. É considerada uma etapa fundamental no processo de produção de mudas *in vitro*, posto que, durante o cultivo, as plantas se desenvolvem em ambiente com alta umidade relativa e meio de cultivo com elevado teor nutrientes e energia, resultando em estruturas fisiológicas e anatômicas pouco adaptadas ao ambiente externo. A aclimatação é necessária, a fim de evitar a morte das plântulas, em decorrência da drástica mudança de ambiente. Assim sendo, gradualmente, estruturas funcionais como cutícula, estômatos operantes e sistemas radiculares eficientes são desenvolvidos com o objetivo de melhorar a adaptação das plantas no campo (CARVALHO, 2012).

3.4 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM PALMEIRAS

De forma geral, a embriogênese somática em palmeiras é um processo lento e altamente complexo, com predomínio da via indireta (SILVA-CARDOSO *et al.*, 2019b). Na Tabela 1, estão descritos os principais trabalhos recentes e relevantes sobre embriogênese somática em palmeiras.

Tabela 3- Principais trabalhos de embriogênes e somática em palmeiras publicados nos últimos anos. Autor	Espécie	Explante	Meio base e outros Componentes (g.L ⁻¹)	Hormônios (µM) e tratamentos testados por fase			
				Indução	Desenvolvimento/ Multiplicação	Diferenciação/Maturação	Regeneração
BALZON et al., 2013	<i>Elaeis guineensis</i> Jacq. (dendezeiro)	Embrião zigótico maduro	Meio base e outros Componentes (g.L ⁻¹)	MS modificado 450 2,4D ou 450 Picloram	MS modificado (40 de Picloram ou 40 2,4D) + 10 2ip	MS modificado 12,3 2ip + 0,54 ANA	½ MS -
			sacarose	30	30	30	20
			phytagel	2,5	2,5	2,5	2,5
			Carvão ativado	2,5 ou 0,0	-	-	2,5
Resultados	A indução foi mais satisfatória com 450 µM de Picloram e com carvão. A proliferação de calos ocorreu de forma mais satisfatória em 40 µM de Pic+ 10 2ip. Houve formação de plântulas normais com extensas raízes após 8-24 semanas.						
Freitas et al., 2016.	<i>Euterpe oleracea</i> Mart. (Açaí-do-Pará)	Embrião zigótico maduro e imaturo	Meio base e outros componentes (g.L ⁻¹)	MS 225 ou 450 Picloram	MS 0,6 ANA + 12,30 2ip	MS 1,0 BAP + 0,5 GA ₃	
			glutamina	0,5	-	-	
			sacarose	30	30	30	
			phytagel	2,5	2,5	2,5	
			Carvão ativado	2,5	0,3	1,5	
Resultados	A indução foi mais eficiente, em 450 µM de Picloram, independente do estágio de desenvolvimento do embrião zigótico. A regeneração teve sucesso, plântulas possuíam parte aérea e raízes normais.						
MAZRI et al., 2018.	<i>(Phoenix dactylifera L.)</i> cv. Mejhoul (Tamareira)	Segmentos de gemas adventícias cultivadas <i>in vitro</i>	Meio base e outros componentes (g.L ⁻¹)	MS 5 2ip + (22,5; 45; 90; 225; 450 de dicamba ou Picloram)	MS -	MS 10-50 de ABA e/ou 30 g. L-1 de sorbitol, manitol ou (PEG) (5-50 g/L)	MS 2,5 de ANA + 2,5 BA
			PVP	1	1	1	1
			sacarose	30	30	30	30
			ágar	6	6	6	6
			Carvão ativado	1	1	0,5	0,5
Resultados	Na indução, dicamba foi significativamente inferior ao picloram. O meio ideal para indução foi 5 µM de 2ip + 45 µM de picloram, já que os intervalos de 45 a 450 µM de picloram foram estatisticamente iguais. PEG na dose de 20 e 30 g.L ⁻¹ promoveram melhor maturação de embriões somáticos, enquanto ABA teve efeito inibitório. O manitol também foi inibitório, causando escurecimento dos embriões. A germinação obteve sucesso de 52,0%. As mudas regeneradas foram transferidas para a estufa onde 76,0% delas sobreviveram.						
SILVA-CARDOSO et al., 2019 a	<i>Syagrus oleracea</i> (gueroba)	Inflorescência imatura	Meio base e outros componentes (g.L ⁻¹)	MS 4,52 2,4D ou Picloram	MS 30 dias- 2,26 2,4D ou 40 Picloram 30 dias- 0,45 2,4D ou 10 Picloram 30 dias- 0,045 2,4D ou 5 Picloram	MS -	
			Glutamina	0,5	0,5	0,5	
			cisteína	0,2	0,5	0,5	
			Caseína hidrolisada	-	0,5	0,5	

			sacarose	30	30	30	
			Phytigel	2,5	2,5	2,5	
			Carvão ativado	-	-	2,5	
Resultados	Picloram em baixa concentração (4,52 µM) possibilitou a formação de calos embriogênicos. O processo foi assíncrono com provável origem multicelular. Nas condições utilizadas neste estudo, os embriões somáticos formados eram deficientes em reservas de polissacarídeos e proteínas. A regeneração de plântulas ocorreu, porém com elevada fusão da parte aérea e dificultou o isolamento das plântulas para serem aclimatizadas.						
MEIRA et al., 2020	<i>Acrocomia aculeata</i> (macaúba)	folhas imaturas de plantas adultas	Meio base e outros componentes (g.L⁻¹)	Y3 modificado	Y3 modificado	Y3 modificado	
				450 2,4D ou Picloram+ (0 ou 20 2ip)	450 Picloram	0; 10; 20;40; 80 e 120 Picloram ou 2,4D	-
			Glutamina	0,5	0,5	0,5	0,5
			sacarose	30	30	30	30
			Vitaminas e FeEDTA (MS)	Vitaminas e FeEDTA (MS)	Vitaminas e FeEDTA (MS)	Vitaminas e FeEDTA (MS)	Vitaminas e FeEDTA (MS)
			Phytigel	2,5	2,5	2,5	2,5
			Carvão ativado	2,5	2,5	2,5	
Resultados	Picloram proporcionou os melhores resultados para indução de calos, quando os explantes foram mantidos por até nove meses em meio de cultura (64,9%). A utilização de 2ip teve efeito inibitório para a formação de calos. As porções mais distantes do meristema apical foram as que proporcionaram a maior formação de calos. A formação dos embriões somáticos foi observada a partir da fase de multiplicação dos calos. A regeneração de plântulas não ocorreu com a redução nas concentrações de reguladores de crescimento.						
DE CAMPOS, et al., 2020.	<i>Butia odorata</i> (butiá)	Embrião zigótico maduro	Meio base e outros componentes (g.L⁻¹)	MS ou Y3	MS ou Y3	MS ou Y3	½ MS
				0; 361,9; 452,5; 542,9 e 633,5 de 2,4 D ou (0, 50, 150, 300 e 450 de Picloram.	20 e 40 de Picloram+ 10 de 2ip	0,54 NAA + 12,3 2ip	-
			glutamina	0,2	0,2	0,2	0,2
			Asparagina	0,1	0,1	0,1	0,1
			arginina	0,1	0,1	0,1	0,1
			sacarose	30	30	30	30
			Phytigel	2,3	2,3	2,3	2,3
			Vitaminas e FeEDTA (MS)	Vitaminas e FeEDTA (MS)	Vitaminas e FeEDTA (MS)	Vitaminas e FeEDTA (MS)	Vitaminas e FeEDTA (MS)
			Carvão ativado	2	-	2	
Resultados	A formação de calos primários ocorreu nos tratamentos com 361,99 µM de 2, 4D e 50 µM Picloram em meio Y3; no entanto os embriões zigóticos tendem a germinar em meio sem auxina. O desenvolvimento e multiplicação de calos foi mais satisfatório em meio contendo 20 µM de Picloram, já que o 2,4D promoveu muita oxidação. A germinação de embriões somáticos não ocorreu, e foram observados muitos embriões fundidos.						
SILVA-CARDOSO et al., 2022	<i>Syagrus oleracea</i> (gueroba)	Inflorescência imatura	Meio base e outros componentes (g.L⁻¹)	MS	MS	½ MS	
				0; 225; 450 e 675 2,4D ou Picloram	30 dias- 40 2,4D ou 40 Picloram	-	
					30 dias- 10 2,4D ou 10 Picloram		
					30 dias- 5,0 2,4D ou 5 Picloram		
					60 dias- dias 1,0 2,4D ou Picloram		
					30 dias- 0,45 2,4D ou Picloram		
					30 dias- 0,45 2,4D ou Picloram		
Glutamina	0,2	0,5	-				
cisteína	0,2	0,5	-				
Caseína hidrolisada	-	0,5	-				
sacarose	30	30	30				
Phytigel	2,5	2,5	2,5				
Carvão ativado	2,5	0,1 (1ª ao 3º subcultivo) 0,0 (4º ao 6º)	1,5				

Resultados	O picloram foi mais eficiente que o 2,4-D para indução de calos e na formação de estruturas embriogênicas. Tecidos mais imaturos provenientes de inflorescências não foram mais responsivos à formação de calos que tecidos menos imaturos, embora tenham sido mais embriogênicos. O processo somático embriogênico foi relativamente lento, assíncrono e marcado por anormalidades, como fusão de embriões somáticos. A regeneração não ocorreu, onde foi detectada fusão de embriões somáticos e germinação precoce.						
FERREIRA et al., 2022a	<i>Euterpe precatoria</i> (Açaí da mata)	Embrião zigótico maduro	Meio base e outros componentes (g.L⁻¹)	MS ou Y3	MS ou Y3	T1- Y3 T2- ½ Y3	½ Y3
				0; 6,79; 13,57; 20,36 e 27,15 de 2,4 D ou Picloram.	2,46 de 2iP + (4,14 de 2,4-D ou Picloram)	T1 - 0,54 (ANA) + 12,3 de 2iP T2 - sem fitoregulador	-
			Glutamina, cisteína e caseína hidrolisada.	0,5	0,5	T1- 0,5 T2 0,25	-
			sacarose	30	30	30	30
			Vitaminas e FeEDTA (MS)	Vitaminas e FeEDTA (MS)	Vitaminas e FeEDTA (MS)	Vitaminas e FeEDTA (MS)	Vitaminas e FeEDTA (MS)
			Phytigel	2,3	2,3	2,3	2,3
			asparagina	-	-	T1 0,0 T2 0,25	-
Carvão ativado	-	-	1,5	1,5			
Resultados	O melhor resultado para indução foi obtido quando o Picloram (13,57 e 20,36 µM) foi associado aos sais do meio Y3. A maior proliferação de calos ocorreu no meio Y3 + 4,14 µM Picloram + 2,46 µM 2iP. Os dois meios testados de maturação foram igualmente eficientes para interromper os ciclos de divisões celulares e promover a maturação dos embriões somáticos. O meio de germinação foi satisfatório e resultou em plântulas normais.						
FERREIRA et al., 2022b	<i>Euterpe precatoria</i> (Açaí solteiro)	Tecidos foliares de plantas adultas	Meio base e outros componentes (g.L⁻¹)	MS ou Y3	MS ou Y3	T1- ½ MS T2, T3, T4, T5 - MS	½ MS
				E1- 0, 225, 450, 675 e 900 µM de 2,4 D ou Picloram e Efeito região palmito (basal, medial, apical E2 Idem E1+ 45 2ip	5 de 2iP + (20 de 2,4-D ou Picloram)	T1 - sem fitoregulador T2 - 5,0 ABA T3 - 25 g. L-1 PEG T4- 2,5 ABA + 12,5 g. L-1 PEG T5- 60 g L-1 de sacarose.	-
			Glutamina, cisteína e caseína hidrolisada.	0,5	0,5	T1- 0,1 (Glutamina, cisteína) e 0,5 caseína hidrolisada T2, T3, T4 e T5- 0,0	-
			sacarose	30	30	T1, T2, T3, T4- 30 T5- 60	30
			Vitaminas e FeEDTA (MS)	Vitaminas e FeEDTA (MS)	Vitaminas e FeEDTA (MS)	Vitaminas e FeEDTA (MS)	Vitaminas e FeEDTA (MS)
			Phytigel	2,3	2,3	2,3	2,3
			Carvão ativado	2,5	-	1,5	1,5
Resultados	Na fase de indução, o Picloram se destacou na produção de calos nas concentrações 450 ou 675 µM, que não diferiram entre si estatisticamente. As regiões de palmito mais responsivas à indução foram as regiões mediana e apical. O meio MS suplementado com 20 µM de Picloram e 5 µM de 2iP foi eficiente na multiplicação de estruturas embriogênicas. Todos os tratamentos testados na fase de maturação proporcionaram desenvolvimento de embriões somáticos semelhantes a torpedo, não diferindo entre si estatisticamente em número, no entanto a combinação 2,5 µM de ABA + 12,5 g L-1 de PEG proporcionou a formação de embriões somáticos mais individualizados e alongados. A germinação foi satisfatória, com formação de parte aérea e raízes normais.						

MS (Meio Murashige e Skoog, 1962); Y3 (Meio Eeuwens 1976); Dicamba (ácido 3,6-dicloro-o-anísico); Picloram (4-amino- 3,5,6-tricloropicolínico); BA (6-Benziladenina); NAA/ ANA (Ácido 1-naftalenoacético); 2ip (6-(dimetilalilamino)purina); ABA (ácido abscísico); PEG (Polietilenoglicol); NOA (2-ácido naftoxiacético); PVP (polivinilpirrolidona). Nota: ½ MS ou Y3- Meio de cultivo com metade da concentração salina original.

3.4.1 Explantes e meios de cultivo

Diferentes explantes podem ser utilizados para a indução da embriogênese somática (ES), tais como embriões zigóticos, cotilédones, meristemas apicais, caules, folhas e tecidos florais (CORREDOIRA *et al.*, 2019; MARTÍNEZ *et al.*, 2019). Nesse sentido, a idade fisiológica dos tecidos escolhidos é crucial para uma maior taxa de formação de células embriogênicas, pois tecidos mais jovens e pouco lignificados tendem a responder melhor aos tratamentos de indução (FREITAS *et al.*, 2016). Em plantas monocotiledôneas, a competência embriogênica restringe-se principalmente a células de origem embriogênica ou meristemática, incluindo sementes e bases foliares (FEHÉR, 2005). Em palmeiras que não perfilham, há ainda a limitação quanto ao uso do meristema apical foliar como explante, uma vez que a sua retirada pode levar à morte da planta matriz (SILVA-CARDOSO *et al.*, 2019b; REE e GUERRA, 2015).

Nos estudos avaliados (Tabela 3), o explante mais utilizado na embriogênese somática de palmeiras foi o embrião zigótico (44%), seguido por inflorescências imaturas (22%), tecidos foliares (22%) e gemas adventícias (12%). Os tecidos embrionários geralmente apresentam alta capacidade regenerativa, são frequentemente usados como ponto de partida (modelo) para o cultivo *in vitro* em diversas espécies (SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2006). Ainda mais, apresentam outras vantagens semelhantes às inflorescências imaturas, como menor risco de contaminação, abundância, alta disponibilidade e menor dano à planta matriz (REE e GUERRA, 2015; SILVA-CARDOSO *et al.*, 2019b). O uso de embriões zigóticos apesar de apresentar maior responsividade, a clonagem de um genótipo ainda desconhecido do ponto de vista agrônômico pode não ser interessante. De tal modo, é possível utilizar diversos tipos de explantes para iniciar estudos de embriogênese somática em palmeiras, cada um com suas vantagens e limitações e as informações geradas poderão ser adaptadas para o uso de explantes provenientes de plantas adultas, como inflorescências e folhas imaturas.

Os meios de cultivo utilizados nos estudos analisados foram, predominantemente, os meios MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e Y3 (EEUWENS, 1976), sendo o meio MS o mais amplamente utilizado. Contudo DE CAMPOS *et al.* (2020) e FERREIRA *et al.* (2022a) observaram desempenho superior do meio Y3 em comparação ao meio MS para as espécies *Butia odorata* e *Euterpe precatoria*, respectivamente. De modo geral, nas fases iniciais da embriogênese, os meios de cultivo foram aplicados em sua

concentração total (100%), enquanto, nas etapas subsequentes, especialmente durante a regeneração, a concentração mais frequentemente utilizada foi reduzida para 50%.

3.5 Fitorreguladores de crescimento na embriogênese somática de palmeiras

A auxina é um regulador-chave dos estágios iniciais da embriogênese somática, estando associada, principalmente, à sua distribuição espacial e temporal (SMIT e WEIJERS, 2015; ELHITI e STASOLLA, 2016). Auxinas como AIA (ácido indol-3-acético), AIB (ácido indol-3-butírico), ácido 2-naftoxiacético (2-NOA) e ácido naftalenoacético (ANA) são passíveis de induzir embriões somáticos. No entanto o fitorregulador mais utilizado é o 2,4-D, que apresenta melhor eficiência em diversas espécies (WÓJCIK *et al.*, 2020; GARCIA *et al.*, 2022). Sob outra perspectiva, em palmeiras, de acordo com o levantamento dos trabalhos mais recentes (Tabela 3), o Picloram parece induzir a embriogênese somática com maior eficiência em relação ao 2,4D.

Nas plantas, as auxinas são sintetizadas sobretudo no meristema apical da parte aérea, nas sementes e nas folhas jovens. Sua principal função é controlar a divisão celular, a identidade celular e a expansão celular (GRIENEISEN *et al.*, 2007). O acúmulo de auxina endógena, particularmente o AIA, é essencial para modificar o destino celular e estabelecer a base para os processos embriogênicos (ASGHAR *et al.*, 2023). Esse acúmulo pode ser estimulado pela aplicação de auxinas exógenas, que provoca distúrbios no metabolismo endógeno de auxinas (FEHÉR *et al.*, 2003).

A citocinina é também um fitorregulador essencial para diversos aspectos do crescimento e acredita-se que esteja envolvida na desdiferenciação e no desenvolvimento de eventos morfogenéticos (GE *et al.*, 2006). As citocininas são importantes, por exemplo, para a formação do câmbio vascular (WANG, 2020). O uso de citocininas, em fases mais avançadas do desenvolvimento embrionário, é importante para a completa diferenciação, sendo recomendadas especialmente nas fases de diferenciação e maturação dos embriões somáticos (SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.* 2010). No entanto, quando aplicadas em excesso, podem intensificar o estresse oxidativo e levar à morte dos tecidos (SARASAN *et al.*, 2002). Nos trabalhos avaliados relacionados à embriogênese somática em palmeiras (Tabela 3), a citocinina mais utilizada foi a 6-(dimetilalilamino) purina (2ip).

3.6 Indução de ES em Palmeiras

Quando foram utilizados embriões zigóticos como explantes, testaram-se doses variando de 0 até 633,5 μM de picloram ou 2,4-D (Tabela 3). As respostas variaram bastante em função da espécie e das condições de cultivo; no entanto os melhores resultados foram observados com picloram, na faixa de 13,57 a 450 μM . Além disso, o picloram proporcionou melhor resposta na indução da embriogênese somática (ES) em comparação ao 2,4-D. Já nas inflorescências imaturas, as doses investigadas variaram entre 0 e 675 μM de 2,4-D ou picloram. A melhor resposta foi obtida com o uso de picloram, porém a dose mais responsiva foi muito variável para as espécies avaliadas.

Outro fator relevante a ser considerado foi o tempo de permanência do explante no meio de indução. Em embriões zigóticos de *Elaeis guineensis*, o início da formação de calos ocorreu entre quatro e seis semanas, entretanto calos embriogênicos só foram observados após 12 semanas (BALZON *et al.*, 2013). Em *Euterpe precatoria*, utilizando embriões zigóticos (FERREIRA *et al.*, 2022a) e tecidos foliares (FERREIRA *et al.*, 2022b), o surgimento de calos aconteceu entre quatro e nove semanas, porém os embriogênicos foram entre oito e 12 semanas após. De forma semelhante, em gemas adventícias de *Phoenix dactylifera*, calos embriogênicos foram observados apenas a partir da 24^a semana, não obstante não embriogênicos terem sido formados nas primeiras quatro semanas (MAZRI *et al.*, 2017). Em embriões zigóticos de *Butia odorata*, calos surgiram com 21 semanas e os embriogênicos somente a partir de 34 semanas (DE CAMPOS *et al.*, 2020). Esses resultados demonstram que o tempo de exposição ao meio de indução é um fator importante para a embriogênese somática em palmeiras, especialmente quando se objetiva a formação de calos com potencial embriogênico, a qual tende a ocorrer posteriormente à formação de calos não embriogênicos. Assim sendo, esses dados evidenciam a importância do monitoramento anatômico nas fases iniciais da embriogênese somática, a fim de identificar sinais embriogênicos e potencializar a formação de embriões a partir do maior número possível de calos.

3.7 Desenvolvimento / Multiplicação

Alguns autores não diferenciam as fases de desenvolvimento e maturação (Tabela 3), o que ocorre, comumente, apenas com ajustes no número de subcultivos. De modo geral, observa-se a tendência de redução dos níveis de auxina e adição de

citocininas para favorecer o desenvolvimento dos embriões somáticos. Dos nove trabalhos apresentados na Tabela 3, todos trazem a redução na concentração de auxina como alternativa para obter sucesso. Desses, pelo menos cinco utilizaram a citocinina 2-iP para auxiliar no desenvolvimento embrionário. Entre esses trabalhos, MEIRA *et al.* (2020) relataram a diferenciação de alguns embriões já na fase de multiplicação, possivelmente, em função da maior dose de carvão ativado no meio ($2,5 \text{ g. L}^{-1}$), o que pode ter causado maior adsorção de auxina, ao longo do tempo, favorecendo a maturação dos embriões somáticos.

3.8 Diferenciação / Maturação

Nesta fase, todos os trabalhos apresentados na Tabela 3 reduziram drasticamente a concentração de auxinas. O uso de agentes osmóticos foi relatado apenas nos estudos de FREITAS *et al.* (2016) e FERREIRA *et al.* (2022b). Consequentemente, esses resultados reforçam a importância da diminuição de auxinas na fase de diferenciação e maturação dos embriões. Contudo percebe-se que ainda são escassas informações a respeito dessa etapa para as palmeiras.

3.9 Regeneração

Sete dos nove trabalhos analisados não utilizaram reguladores de crescimento na fase de regeneração, sendo o meio básico e a exposição à luz aparentemente suficientes para a germinação dos embriões somáticos de palmeiras. No entanto quatro estudos detectaram alguma anomalia na regeneração de plântulas, especialmente, fusão e deformação de plântulas.

Em conformidade com os trabalhos avaliados, a embriogênese somática em palmeiras ocorre de forma assíncrona e desuniforme, com diferentes estágios de desenvolvimento, ocorrendo simultaneamente mesmo sob condições controladas. A etapa de indução foi considerada como a mais divergente entre as espécies analisadas, com variações de explantes, tipo e concentração de fitorreguladores e tempo de resposta à calogênese.

3.10 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A embriogênese somática (ES) é uma estratégia fundamental para a propagação clonal de plantas, especialmente, daquelas com limitações de reprodução vegetativa, mas também de alto valor econômico, como as palmeiras. Nos últimos anos, avanços significativos foram alcançados no entendimento dos processos biológicos envolvidos na ES, permitindo o desenvolvimento de protocolos mais eficientes. No entanto, mesmo que considerada como muito importante para o sucesso dessa tecnologia, a etapa de indução ainda é pouco elucidada. Assim sendo, compreender os mecanismos subjacentes à indução é essencial para ampliar a aplicabilidade e a eficiência da embriogênese somática em programas de melhoramento e conservação.

Para além disso, essa revisão demonstra que o sucesso da embriogênese somática depende de uma série de fatores integrados, entre os quais destacam-se: o tipo e a idade fisiológica do explante, a composição do meio de cultivo e fitorreguladores de crescimento. Por esse motivo, os embriões zigóticos são amplamente utilizados como modelo em virtude de sua elevada competência embriogênica, embora explantes de plantas adultas sejam mais desejáveis para fins de clonagem de genótipos superiores. Em se tratando de palmeiras, a conversão de embriões somáticos, em plântulas completas e normais, ainda é incipiente, tornando ainda mais necessário o aprimoramento da tecnologia para esse grupo de plantas.

De forma complementar, a aplicação da ES extrapola a multiplicação de mudas, sendo também essencial para a conservação de germoplasma, transformação e edição genética, estudo de mecanismos de estresse e produção de metabólitos secundários. Nesse sentido, é que a compreensão aprofundada dos mecanismos que regulam a competência embriogênica e os aspectos preliminares de indução da embriogênese somática são considerados essenciais para superar as limitações atuais e maximizar o potencial dessa tecnologia em espécies de interesse agrícola e florestal.

3.11 REFERÊNCIAS

- ADERKAS, V.P. *et al.* Effect to flight conditions on anatomical and biochemical aspects of somatic and zygotic embryos of hybrid larch (*Larix x marschlinii*). **Annals of Botany**, v. 115, p. 605–615, 2015. DOI <https://doi.org/10.1093/aob/mcu254>
- AL-KHAYRI, J.M; AL-BAHRANY, A.M. Effect of abscisic acid and polyethylene glycol on the synchronization of somatic embryo development in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **Biotechnology**, v. 11, p.318–325, 2012. DOI: 10.3923/biotech.2012.318.325
- ALMEIDA, J.A.S.; SILVAROLLA, M.B. Induction of somatic embryos of *Coffea arabica* genotypes by 6-benzyladenine. **International Journal of Plant Developmental Biology**, v.3, p.5-9, 2009. Disponível em: [http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/0906/IJPDB_3\(1\)/IJPDB_3\(1\)5-9o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/0906/IJPDB_3(1)/IJPDB_3(1)5-9o.pdf)
- ASGHAR, S., GHORI, N., HYAT, F., LI, Y., & CHEN, C. Use of auxin and cytokinin for somatic embryogenesis in plants: a story from competence towards completion. **Plant Growth Regulation**, v. 99, n.3, p. 413–428., 2023. DOI <https://doi.org/10.1007/s10725-022-00923-9>
- ASLAM, J; MUJIB, A; FATIMA, S; SHARMA, M. P. Cultural conditions affect somatic embryogenesis in *Catharanthus roseus* L. (G.) Don. **Plant Biotechnol Rep** v. 2, p. 179–189, 2008. DOI <https://doi.org/10.1007/s11816-008-0060-9>
- BALZON, T. A; LUIS, Z. G; SCHERWINSKI-PEREIRA JE. New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v.49, n.1, p. 41-50, 2013. DOI <https://doi.org/10.1007/s11627-012-9479-3>
- BANDUPRIYA, H.D.D; FERNANDO, S.C; VIDHANAARACHCHIL, Y.R.M. Micropropagation and androgenesis in coconut: an assessment of Sri Lankan implication. **Cocos**, v. 22, n.11, p.31–44, 2016. DOI <https://doi.org/10.4038/cocos.v22i11.5810>
- BARBARA, W., MALWINA, B., JOANNA, M., MARIA, W. A., TOMASZ, N., JAGNA, K., *et al.* Trichostatin a triggers an embryogenic transition in Arabidopsis explants via an auxin-related pathway. **Front. Plant Sci**, v.9, p.1353–1372, 2018. DOI <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01353>
- BENIN, G. *et al.* Comparações entre medidas de dissimilaridade e estatísticas multivariadas como critérios no direcionamento de hibridações em aveia. **Ciência Rural**, n. 33, p. 657- 662, 2003. DOI <https://doi.org/10.1590/S0103-84782003000400011>
- BESSON, J.C.F., OLIVEIRA, L.K., BONETT, L.P., AND STEFANELLO, S. Fontes e concentrações de carboidratos no crescimento vegetativo e no enraizamento in vitro de *Miltonia flavescens* Lindl. **Revista Brasileira de Biociências**. v. 8, p.9–13, 2010. Disponível em: <https://seer.ufrgs.br/index.php/rbrasbioci/article/view/114904/62194>
- BORÉM, A.; MIRANDA, G.V.; FRITSCHÉ-NETO, R. **Melhoramento de plantas**. 7^a ed. Editora UFV. Viçosa: UFV, 2017. 543 p.
- CARVALHO, J. M. F. C; SILVA M. M. DE A; MEDEIROS, M. J. L. **Fatores inerentes à Micropropagação**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 28. (Embrapa Algodão.

Documentos, 148). Disponível em:
<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/276578/1/DOC148.pdf>

CARVALHO, A. C. P. P.; RODRIGUES, A. A. J.; SANTOS, E.O. **Produção de mudas micropropagadas de bananeira**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, Circular Técnica nº 37, 14 p., 2012. Disponível em:
<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/942959/1/CIT12001.pdf>

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 <https://doi.org/10.1590/S0103-84782010000800026>

CHRISTIANSON, M. L; WARNICK, D. A. Competence and Determination in the Process of *in vitro* Shoot organogenesis. **Developmental Biology**, v. 95, ed.2, p. 288-293, 1983. DOI [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(83\)90029-5](https://doi.org/10.1016/0012-1606(83)90029-5)

CHOI YE, YANG DC, PARK JC, SOH WY & CHOI KT. Regenerative ability of somatic single and multiple embryos from cotyledons of Korean ginseng on hormone-free medium. **Plant Cell Rep**, v 17, p. 544–551, 1998. DOI <https://doi.org/10.1007/s002990050439>

CIPRIANO, J. L. D., CRUZ, A. C. F., MANCINI, K. C., SCHMILDT, E. R., LOPES, J. C., OTONI, W. C., & ALEXANDRE, R. S. Somatic embryogenesis in *Carica papaya* as affected by auxins and explants, and morphoanatomical-related aspects. **Anais Da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90,1, p.385–400, 2018. DOI <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820160252>

CORREDOIRA, E., MERKLE, S. A., MARTÍNEZ, M. T., TORIBIO, M., CANHOTO, J. M., e CORREIA, S. I. Non-Zygotic Embryogenesis in Hardwood Species. **Crit. Rev. Plant Sci**, v. 38, p. 1–69, 2019. DOI [10.1080/07352689.2018.1551122](https://doi.org/10.1080/07352689.2018.1551122)

DE CAMPOS, S. S, SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. BERND, R. B., FIOR, C. S., & SCHWARZ, S. F. Somatic embryogenesis as an alternative for *in vitro* multiplication of *Butia odorata* from mature zygotic embryos. **Anais Da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92 (supp1), p.1–13, 2020. DOI <https://doi.org/10.1590/0001-3765202020181215>

D. GAJ, M. Direct somatic embryogenesis as a rapid and efficient system for *in vitro* regeneration of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 64, p. 39–46, 2001. DOI <https://doi.org/10.1023/A:1010679614721>

DE RYBEL, B.; AUDENAERT, D.; BEECKMAN, T.; KEPINSKI, S. The Past, Present, and Future of Chemical Biology in Auxin Research. **ACS Chemical Biology**, v.4, p.987–998, 2009. DOI <https://doi.org/10.1021/cb9001624>

DU, Y., CHENG, F., & ZHONG, Y. Induction of direct somatic embryogenesis and shoot organogenesis and histological study in tree peony (*Paeonia* sect. Moutan). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.141, n.3, p. 557–570, 2020. DOI <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01815-4>

- DUCROCQ, C., SANGWAN, RS, e SANGWAN-NORREEL, BS. Production of Agrobacterium-mediated transgenic fertile plants by direct somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Datura innoxia*. **Plant Molecular Biology**, v. 25, n.6, p. 995–1009, 1994. DOI <https://doi.org/10.1007/BF00014673>
- ELHITI, M.; STASOLLA, C.; WANG, A. Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. V. 49, p. 631-642, 2013. DOI <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9547-3>
- FARIA, J.P., ALMEIDA, F., SILVA, L.C.R., VIEIRA, R.F., AGOSTINI-COSTA, T.S. Chemical characterization of pulp of *Butia capitata* var *capitata*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, p.827–829, 2008. DOI <https://doi.org/10.1590/S0100-29452008000300045>
- FARIA, J.P., ALMEIDA, F., SILVA, L.C.R., VIEIRA, R.F., AGOSTINI-COSTA, T.S. Chemical characterization of pulp of *Butia capitata* var *capitata*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n. 3, p. 827–829, 2008. DOI <https://doi.org/10.1590/S0100-29452008000300045>
- 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. DOI <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.07.005>
- FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to na embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.74, p.201-228, 2003. DOI <https://doi.org/10.1023/A:1024033216561>
- FEHÉR, A. Why Somatic Plant Cells Start to form Embryos?. In: Mujib, A., Šamaj, J. (eds) Somatic Embryogenesis. Plant Cell Monographs, vol 2. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/7089_019
- FERREIRA, J. C. B. DE ARAÚJO SILVA-CARDOSO, I. M., MEIRA, R. O. DA SILVA COSTA, F. H., & SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Towards development of an efficient somatic embryogenesis protocol for the palm tree *Euterpe precatoria* (Mart.) from leaf tissues of adult plants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 58, n.5, p.750–768, 2022b. DOI <https://doi.org/10.1007/s11627-022-10310-8>
- FERREIRA, J. C. B. DE ARAÚJO SILVA-CARDOSO, I. M; DE OLIVEIRA MEIRA, R; SCHERWINSKI PEREIRA, J.E. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of the palm tree *Euterpe precatoria* Mart. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 148, p. 667–686, 2022a. DOI <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02227-2>
- FISHER, A. C., KAMGA, M. H., AGARABI, C., BRORSON, K., LEE, S. L., e YOON, S. (2019). The Current Scientific and Regulatory Landscape in Advancing Integrated Continuous Biopharmaceutical Manufacturing. **Trends in Biotechnology**, v.37, n.3, p. 253–267. DOI <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.08.008>
- FREITAS, E.O; MONTEIRO, T. R; NOGUEIRA, G.F e SCHERWINSKIPEREIRA J.E. Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos of the açai palm (*Euterpe oleracea*): Induction of embryogenic cultures, morphoanatomy and its morphological characteristics. **Sci Hortic-Amsterdam** v.212, p.126-135, 2016. DOI <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.09.044>

GARCIA, C., FURTADO DE ALMEIDA, A. A., COSTA, M., BRITTO, D., VALLE, R., ROYAERT, S., & MARELLI, J. P. Abnormalities in somatic embryogenesis caused by 2,4-D: an overview. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.137, n.2, p. 193–212, 2019. DOI <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01569-8>

GARCIA, C; ALMEIDA, F.A.A; BRITTO, D; CORREA., P.M; SILVA, L; SILVA, J; ROYAERT, S; MARELLI, P.J. Single-base resolution methylomes of somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* L. reveal epigenome modifications associated with somatic embryo abnormalities. **Scientific Reports**, v.12, n1, p.1-19, 2022. DOI <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18035-9>

GE, L; YONG, J.W.H; TAN, S.N; ONG, E. S. Determination of cytokinins in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry. **Electrophoresis** v, 27, n,11, p.2171–2181, 2006. DOI <https://doi.org/10.1002/elps.200500465>

GOW, W. P; CHEN, J. T; CHANG, W. C. Effects of genotype, light regime, explants position and orientation on indirect somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids. **Acta Physiologiae**, v. 31, p. 363–369, 2009. DOI <https://doi.org/10.1007/s11738-008-0243-6>

GRANJA, M.M.C; MOTOIKE, S.Y; ANDRADE, A.P.S; CORREA, T.R; PICOLI, E.A.T; KUKI, K.N. Explant origin and culture media factors drive the somatic embryogenesis response in *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart., an emerging oil crop in the tropics. **Industrial Crops and Products**, v. 117, p.1–12, 2018.DOI <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.074>

GRIENEISEN, V.A; XU, J; MARÉE, A.F.M; HOGEWEG, P; SCHERES, B. Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. **Nature**, v. 449, p. 1008–1013, 2007. DOI <https://doi.org/10.1038/nature06215>

GUAN, Y., LI, S. G., FAN, X. F., AND SU, Z. H. Application of somatic embryogenesis in woody plants. **Front. Plant Sci.** v. 7, p. 938, 2016. DOI [10.3389/fpls.2016.00938](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00938)

GULZAR, B.; MUJIB, A.; MOIEN QADIR, M.; SAYEED, R.; MAMGAIN, J.; EJAZ, B. Genes, proteins and other networks regulating somatic embryogenesis in plants. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 18, p.31, 2020. DOI <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00047-5>

HALPERIN, Walter. Alternative morphogenetic events in cell suspensions. **American Journal of Botany**, v. 53, n. 5, p. 443-453, 1966. DOI <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1966.tb07357.x>

HAPSORO, D., HAMIRANTI, R., AND YUSNITA, Y. In vitro somatic embryogenesis of superior clones of robusta coffee from Lampung, Indonesia: Effect of genotypes and callus induction media. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 21, p. 3811–3817, 2020. DOI <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210849>

HOLLOBIUC, I. Somatic embryogenesis in long-term cultures of *Gentiana lutea* L. in the presence of osmotic stress. In: Rybczyński JJ, Davey MR, Miłkowska A (eds). *The Gentianaceae*, vol 2:Biotechnology and Applications. Springer, Berlin/Heidelberg, p 139–161, 2015. DOI https://doi.org/10.1007/978-3-642-54102-5_6

HORSTMAN, A., BEMER, M., BOUTILIER, K. A transcriptional view on somatic embryogenesis. **Regeneration**. v.4, p. 201–216, 2017. DOI <https://doi.org/10.1002/reg2.91>

IWASE, A; MITSUDA, N; KOYAMA, T; HIRATSU, K; KOJIMA, M; ARAI, T; INOUE, Y; SEKI, M; SAKAKIBARA, H; SUGIMOTO, K. O fator de transcrição AP2/ERF WIND1 controla a desdiferenciação celular em Arabidopsis. **Curr Biol**, v.21, n.6, p.508– 514, 2011. DOI <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.02.020>

KADOKURA, S., SUGIMOTO, K., TARR, P., SUZUKI, T., AND MATSUNAGA, S. (2018). Characterization of somatic embryogenesis initiated from the Arabidopsis shoot apex. **Dev. Biol.** v. 442, p.13–27, 2018. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.04.023>

KROGAN, N.T; MARCOS, D.; WEINER, A.I; BERLETH, T. The auxin response factor MONOPTEROS controls meristem function and organogenesis in both the shoot and root through the direct regulation of PIN genes. **New Phytologist**, v. 212, p.42–50, 2016. DOI <https://doi.org/10.1111/nph.14107>

KUMAR, V., VAN STADEN, J. New insights into plant somatic embryogenesis: an epigenetic view. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.39, p.194, 2017. DOI <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2487-5>

LEITMAN, P., HENDERSON, A., NOBLICK, L., SOARES, K., 2013. Arecaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB15703>

LEYSER, O. Auxin Signaling. **Plant Physiology**, v.176, p. 465–479, 2018. DOI <https://doi.org/10.1104/pp.17.00765>

LI, S. B; XIE, Z. Z; HU, C. G; ZHANG, J. Z. A Review of Auxin Response Factors (ARFs) in Plants. **Front. Plant Sci Frente**, v. 7, p. 47, 2016. DOI <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00047>

LIU, H; ZHANG, H; DONG, Y. X; HAO, Y. J; ZHANG, X. S. DNA METHYLTRANSFERASE1-mediated shoot regeneration is regulated by cytokinin-induced cell cycle in Arabidopsis. **New Phytologist**, v. 217, p. 219–232, 2018. DOI <https://doi.org/10.1111/nph.14814>

LORENZI, H.; NOBLICK, L.R; KAHN, F. e FERREIRA, E. **Flora brasileira: Arecaceae (Palmeiras)**. 1ª ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2010. 384p.

LUIS, Z. G; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. An improved protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from mature zygotic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.118, p.485–496, 2014. DOI <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0500-x>

MAGNANI, E.; JIMÉNEZ-GÓMEZ, J.; SOUBIGOU-TACONNA, L.; LEPINIEC, L.; FIUME, E. Profiling the onset of somatic embryogenesis in Arabidopsis. **BMC Genomics**. **BMC Genomics** v.18, p. 998, 2017. DOI <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4391-1>

MAHDAVI-DARVARI, F; NOOR, N. M; SMANIZAN, I. Epigenetic regulation and gene markers as signals of early somatic embryogenesis. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v. 120, p. 407–422, 2015. DOI <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0615-0>

MARISOL OCHOA-VILLARREAL, HOWAT, S., HONG, S. M. JANG, M. O., JIN, Y. W., LEE, E. K., LOAKE, G. J. Plant cell culture strategies for the production of natural products. **BMB Reports**, v.49, n.3, p. 149–158, 2016. DOI <https://10.5483/BMBRep.2016.49.3.264>

MARTÍNEZ, M. T., SAN-JOSÉ, M. D. C., ARRILLAGA, I., CANO, V., MORCILLO, M., CERNADAS, M. J., *et al.* Holm oak somatic embryogenesis: current status and future perspectives. **Frontiers in Plant Science**, v.10, p.239–252, 2019. DOI 10.3389/fpls.2019.00239

MAZRI, M. A., BELKOURA, I., MEZIANI, R., MOKHLESS, B., NOUR, S. Somatic embryogenesis from bud and leaf explants of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Najda. **3 Biotech**, v.7, n. 58, p.1-9, 2017. DOI <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0676-y>

MAZRI, M. A; MEZIANI, R; BELKOURA I; MOKHLESS, B; NOUR, S. A combined pathway of organogenesis and somatic embryogenesis for an efficient large-scale propagation in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Mejhoul. **3 Biotech**, v.8, n.4, p. 215, 2018. DOI <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1235-x>

MEIRA, F; LUIZ, Z. G; SILVA-CARDOSO, I.M.A; SCHEWINSKI-PEREIRA, J. E. Somatic embryogenesis from leaf tissues of macaw palm [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart]. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 92, n.3, e20180709, 2020. DOI <https://doi.org/10.1590/0001-3765202020180709>

MÉNDEZ-HERNÁNDEZ, H. A *et al.* Signaling Overview of Plant Somatic Embryogenesis. **Frontiers in Plant Science**, v.10, p.77, 2019. DOI <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00077>

MIRONOVA, W. TEALE, M. SHAHRIARI, J. DAWSON, K. PALME. The Systems Biology of Auxin in Developing Embryos. **Trends Plant Sci**, v. 22, n.3, p. 225-235, 2017. DOI <https://10.1016/j.tplants.2016.11.010>

MOHAMED, O.G.; KHALIL, Z.G.; CAPON, R.J. N-Amino-L-Proline Methyl Ester from an Australian Fish Gut-Derived Fungus: Challenging the Distinction between Natural Product and Artifact. **Mar. Drugs**, v. 19, p.151, 2021. DOI <https://doi.org/10.3390/md19030151>

MIRONOVA, W. TEALE, M. SHAHRIARI, J. DAWSON, K. PALME. The Systems Biology of Auxin in Developing Embryos. **Trends Plant Sci**, v. 22, n.3, p. 225-235, 2017. DOI <https://10.1016/j.tplants.2016.11.010>

MUHEDANER, Y., YILIMINUER, ZHANG, Y., AND LIU, K. (2019). Maturation and germination conditions of somatic embryos of *Picea schrenkiana* var. *tianschanica*. **Sci. Silvae Sinicae**, v.55, p.176–183, 2019. DOI 10.11707/j.1001-7488.20190819

NA, H; KIM, K.W; KWACK, Y. *et al.* Comparative anatomy of embryogenic and non-embryogenic calli from *Pimpinella brachycarpa*. **J. Plant Biol**, v. 50, p.344–350, 2007. DOI <https://doi.org/10.1007/BF03030665>

NAMASIVAYAM, P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v.90, p.1–8, 2007. DOI <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9249-9>

NAUSCH, H., E BUYEL, J. F. Cryopreservation of plant cell cultures – Diverse practices and protocols. **New Biotechnology**, v. 62, p.86–95, 2021. DOI <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2021.02.002>

OLARIETA, C. A; MONTALBÁN, I. A e MONCALEÁN, P. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 153, p. 173–190, 2023. DOI <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02457-y>

PAIS, M. S. Somatic Embryogenesis Induction in Woody Species: The Future After OMICs Data Assessment. **Frontiers in Plant Science**, v.10, p.240, 2019. DOI <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00240>

PRUDENTE, D.O., DE SOUZA, L. & PAIVA, R. Plant Somatic Embryogenesis: Modulatory Role of Oxidative Stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences Natl**, v. 90, p. 483–487, 2020. <https://doi.org/10.1007/s40011-019-01136-3>

QUIROZ FIGUEROA; F. R.; ROJAS HERRERA, R.; GALAZ AVALOS, R. M.; LOYOLA VARGAS, V.M. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 86, p. 285-301, 2006. DOI <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9139-6>

REE, J.F; GUERRA, M.P. Palm (Arecaceae) somatic embryogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 51, p.589–602, 2015. DOI <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9722-9>

REMAKANTHAN, A., MENON, T. G., AND SONIYA, E. V. Somatic embryogenesis in banana (*Musa acuminata* AAA cv. Grand Naine): effect of explant and culture conditions. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, v. 50, p. 127–136, 2014. DOI [10.1007/s11627-013-9546-4](https://doi.org/10.1007/s11627-013-9546-4)

RODRIGUES, S. L; DA SILVA, P. A. M; FIGUEIREDO, F.M. Palmeiras (*Arecaceae*) na floresta urbana de sobral, ceará, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Arborização Urbana**, v.18, n.2, p. 47-59, 2023. DOI <https://doi.org/10.5380/revsbau.v18i2.89636>

SÁ, L. F. DE; TAMBARUSSI, E. V. Melhoramento genético como estratégia de gestão da produtividade florestal. **Revista do Instituto Florestal**, v. 35, n. 1, p. 99–112, 2023. DOI <https://doi.org/10.24278/2178-5031.202335106>

SARASAN, V; RAMSAY, M. M; ROBERTS, A. V. In vitro germination and induction of direct somatic embryogenesis in ‘bottle palm’ [*Hyophorbe lagenicaulis* (L. Bailey) H.E. Moore], a critically endangered Mauritian palm. **Plant Cell Rep**, v. 20, p. 1107–1111, 2002. DOI <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0454-z>

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E; MACIEL, T.M.S; COSTA, F.H.S; PEREIRA, M.A.A. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de murmurú (*Astrocaryum ulei*). **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, n.2, p.251–256, 2006. DOI <https://doi.org/10.1590/S1413-70542006000200009>

SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E., DA GUEDES, R.S., FERMINO, P.C.P. *et al.* Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. **In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant**, v. 46, p. 378–385, 2010. DOI <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9279-6>

SCHILLBERG, S., RAVEN, N., FISCHER, R., TWYMAN, R., e SCHIERMEYER, A. Molecular Farming of Pharmaceutical Proteins Using Plant Suspension Cell and Tissue Cultures. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n.31, p.5531–5542, 2013. DOI <https://doi.org/10.2174/1381612811319310008>

STEINER, N.; SANTA-CATARINA, C.; ANDRADE, J. B. R.; BALBUENA, T. S.; GUERRA, M. P.; HANDRO, W.; FLOH, E. I. S.; SILVEIRA, V. *Araucaria angustifolia* Biotechnology-Review. **Functional Plant Science and Biotechnology**, v. 2, p. 20-28, 2008. Disponível em:https://www.researchgate.net/publication/235431641_Araucaria_angustifolia_Biotechnology

SIBBR (Sistema de informação sobre a biodiversidade brasileira). Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil e Lista da Flora do Brasil, 2020. Disponível em: <https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/284398>. Acesso em fevereiro de 2025.

SILVA, P.A.D; SCARIOT, A. Phenology, biometric parameters and productivity of fruits of the palm *Butia capitata* (Mart.) Beccari in the Brazilian cerrado in the north of the state of Minas Gerais. **Acta Botanica Brasilica**, v. 27, p. 580-589, 2013. DOI <https://doi.org/10.1590/S0102-33062013000300015>

SILVA-CARDOSO, I.M.A; MEIRA, F. S; GOMES, A.C.M.M; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Anatomy and histochemistry of somatic embryogenesis of *Syagrus oleracea* from immature inflorescences. **Crop Breed Appl Biotechnol**, v.19, n.4, p.444–450, 2019a. DOI <https://doi.org/10.1590/1984-70332019v19n4n62>

SILVA-CARDOSO, I. M; MEIRA, F. S; GOMES, A. C. M. M; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Histology, histochemistry and ultrastructure of pre-embryogenic cells determined for direct somatic embryogenesis in the palm tree *Syagrus oleracea*. **Physiologia Plantarum**, v. 168, n.4, p. 845–875, 2019b. DOI <https://doi.org/10.1111/ppl.13026>

SILVA-CARDOSO, I.M.A; MEIRA, F. S; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. (2022). The maturity level of explant plays a key role in somatic embryogenesis of the palm tree *Syagrus oleracea* [Mart.]. **Acta Physiologiae Plantarum**, v44, n.87, p1-17. DOI <https://doi.org/10.1007/s11738-022-03420-8>

SIVANESAN, I; NAYEEM, S; VENKIDASAMY, B; KUPPURAJ, S. P; RN, C; SAMYNATHAN, R. Genetic and epigenetic modes of the regulation of somatic embryogenesis: a review. **Biologia Futura**, v.73, n.3, p. 259–277, 2022. DOI <https://doi.org/10.1007/s42977-022-00126-3>

SIVILAY, P., CHOI, Y. E. Somatic embryogenesis from the thin cell layer cultures of zygotic and somatic embryos of *Aesculus hippocastanum*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 60, p. 67–74, 2024. DOI <https://doi.org/10.1007/s11627-023-10396-8>

SMERTENKO, A.; BOZHKO, P.V. Somatic embryogenesis: Life and death processes during apical-basal patterning. **Journal of Experimental Botany**, v.65, p.1343–1360, 2014. DOI <https://doi.org/10.1093/jxb/eru005>

SMIT, M.E; WEIJERS, D. The role of auxin signaling in early embryo pattern formation. **Current Opinion in Plant Biology**, v.28, p. 99–105, 2015. DOI <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.10.001>

SUN, J; WANG, M. J; DING, M. Q; DENG, S. R; LIU, M. Q, LU, C. F; ZHOU, X. Y; SHEN, X; ZHENG, X. J; ZHANG, Z. K; SONG, J. H₂O₂ and cytosolic Ca²⁺ signals triggered by the PM H⁺-coupled transport system mediate K⁺/Na⁺ homeostasis in NaCl-stressed *Populus euphratica* cells. **Plant, Cell and Environment**, v. 33, p. 943–958, 2010. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02118.x>

TEIXEIRA, J. B.; SONDAHL M. R.; KIRBY E. G. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v. 34, p. 227–233; 1993. DOI <https://doi.org/10.1007/BF00029711>

VALE, E. M., REIS, R. S., PASSAMANI, L. Z., SANTA-CATARINA, C., AND SILVEIRA, V. (2018). Morphological analyses and variation in carbohydrate content during the maturation of somatic embryos of *Carica papaya*. **Physiol. Mole. Biol. Plants**, v.24, p. 295. DOI 10.1007/s12298-017-0501-4

VARIS, S; KLIMASZEWSKA, K; ARONEN, T. Somatic embryogenesis and plant regeneration from primordial shoot explants of *Picea abies* (L.) H. Karst. somatic trees. **Front. Plant Sci**, v.9, p. 1551, 2018. DOI <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01551>

VIKRANT, J.P. Progress in understanding the regulation and expression of genes during plant somatic embryogenesis: a review. **J App Biol Biotech**, v. 6, p.49–56, 2018. DOI <https://doi.org/10.7324/JABB.2018.60508>

WANG, H. Regulation of vascular cambium activity. **Plant Science**, v. 291, p. 110322, 2020. DOI <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110322>

WANG, KL-C; LI, H. e ECKER, J.R. Ethylene biosíntese e redes de sinalização. **The Plant Cell**, v.14, p.131–151, 2002. DOI <https://doi.org/10.1105/tpc.001768>

WILLIAMS EG, MAHESWARAN G. Somatic Embryogenesis: Factors Influencing Coordinated Behaviour of Cells as an Embryogenic Group. **Annals of Botany**, v. 57 n.4, p. 443–462, 1986. DOI <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087127>

WÓJCIK, A.M; WÓJCIKOWSKA, B; GAJ, M. D. Current perspectives on the auxin mediated genetic network that controls the induction of somatic embryogenesis in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v.21, n.4, p.1333, 2020. DOI <https://doi.org/10.3390/ijms21041333>

WU, X. M; KOU, S. J; LIU, Y. L; FANG, Y. N; XU, Q; GUO, W. W. Genomewide analysis of small RNAs in nonembryogenic and embryogenic tissues of citrus: microRNA- and siRNA-mediated transcript cleavage involved in somatic embryogenesis. **Plant Biotechnology Journal**. V.13, p. 383-394, 2015. DOI <https://doi.org/10.1111/pbi.12317>

YANG, X. Y; ZHANG, X. L. Regulation of Somatic Embryogenesis in Higher Plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 29, n.1, p. 36–57, 2010. DOI <https://doi.org/10.1080/07352680903436291>

ZAVATTIERI, M. A; FREDERICO, A. M; LIMA, M; SABINO, R; ARNHOLDT-SCHMITT, B. Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions.

Electronic Journal of Biotechnology, v.13, p.12–13, 2010. DOI <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-34582010000100012>

ZEIN EL DIN, A. F. M *et al.* Morpho-Anatomical and Biochemical Characterization of Embryogenic and Degenerative Embryogenic Calli of Phoenix dactylifera L. **Horticulturae**, v. 7, n. 10, p. 393, 2021. DOI <https://doi.org/10.3390/horticulturae7100393>

ZHANG, M; WANG, A; QIN, M; QIN, X; YANG, S; SU, S; SUN, Y; ZHANG, L. Direct and Indirect Somatic Embryogenesis Induction in Camellia oleifera Abel. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p.1–14, 2021. DOI <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.644389>

4. ARTIGOS

4.1 CAPÍTULO I: EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA: RESPOSTAS ESTRUTURAIS E FISIOLÓGICAS DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE *B. capitata* AO MEIO DE CULTIVO, INJÚRIA E REGULADORES DE CRESCIMENTO

RESUMO

A embriogênese somática constitui uma alternativa para a propagação vegetativa de *Butia capitata*, palmeira nativa do Cerrado brasileiro, caracterizada pela presença de meristema apical único e pela impossibilidade de propagação por métodos vegetativos convencionais. Dessa forma, essa técnica viabiliza a formação de pomares clonais altamente produtivos e uniformes. Os objetivos do trabalho foram induzir calogênese e avaliar a competência embriogênica por meio de injúrias mecânicas, uso de meios de cultivo e fitoreguladores em embriões zigóticos. Embriões foram desinfestados, injuriados (esmagamento e seccionamento) e não injuriados e inoculados em dois meios de cultivo do tipo MS e COQ (elaborado no presente trabalho). Outro experimento foi montado utilizando reguladores de crescimento: Picloram e 2,4 D. Foram avaliados, ao longo do cultivo, a oxidação, germinação (alongamento do pecíolo cotiledonar e desenvolvimento da parte aérea, formação e tipo de calos, atividade de enzimas antioxidantes, perfil hormonal e características anatômicas dos calos. Os tratamentos, utilizando o meio COQ associado à injúria, estão correlacionados positivamente com a oxidação, atividade das enzimas antioxidantes e formação de calos com estrutura globular (potencial embriogênico). A ausência de injúria, independente do meio, favorece a germinação dos embriões e desenvolvimento da parte aérea. Os calos originários da injúria e meio COQ apresentam células com características embriogênicas, núcleo evidente e citoplasma denso. O uso de 50 µM de 2,4-D + 300 µM de picloram e 300 µM de Picloram são superiores para a promoção de calos com características embriogênicas; globulares, com células isodiamétricas, citoplasma denso e núcleos evidentes, além de maior concentração de auxinas. O uso de injúrias, meio de cultivo COQ e picloram, favorece a indução da embriogênese somática, o que contribui para viabilizar a propagação vegetativa de *B. capitata*.

Palavras-chave: morfogênese *in vitro*; calogênese; palmeiras nativas do cerrado; 2,4 D; picloram; perfil hormonal; atividade antioxidante.

ABSTRACT

Somatic embryogenesis constitutes an alternative for the vegetative propagation of *Butia capitata*, a palm tree native to the Brazilian Cerrado, characterized by the presence of a single apical meristem and the impossibility of propagation by conventional vegetative methods. In this way, this technique makes it possible to create highly productive and uniform clonal orchards. The aim of this work was to induce callogenesis and evaluate embryogenic competence through mechanical injuries, the use of culture media, and plant growth regulators in zygotic embryos. Embryos were disinfected, injured (crushing and sectioning), and uninjured, and inoculated in two culture media: MS and COQ (developed in this work). Another experiment was set up using growth regulators: Picloram and 2,4-D. They were evaluated, throughout the cultivation period, oxidation, germination (elongation of the cotyledonary petiole and shoot development), callus formation and type, antioxidant enzyme activity, hormonal profile, and anatomical characteristics of the calluses. Treatments using COQ medium associated with injury are positively correlated with oxidation, antioxidant enzyme activity, and callus formation with a globular structure (embryogenic potential). The absence of injury, regardless of the environment, favors embryo germination and development of the aerial section. Calluses originating from injury and COQ medium present cells with embryogenic characteristics, a visible nucleus, and dense cytoplasm. The use of 50 μM of 2,4-D + 300 μM of picloram and 300 μM of picloram are superior for promoting callus formation with embryogenic characteristics. These treatments provide calluses globular, with isodiametric cells, dense cytoplasm, evident nuclei, as well as a higher concentration of auxins. The use of injuries, COQ culture medium, and picloram favors the induction of somatic embryogenesis, being important steps to enable the vegetative propagation of *B. capitata*.

Keywords: *in vitro* morphogenesis, callogenesis, native palm trees of the cerrado biome, 2,4-D, picloram, hormonal profile, antioxidant activity.

4.1.1 INTRODUÇÃO

A embriogênese somática (ES) proporciona a formação de embriões na ausência de fertilização, que podem germinar e também originar um indivíduo clone daquele que forneceu o explante (HORSTMAN *et al.*, 2017; SILVA-CARDOSO *et al.*, 2022). A propagação clonal é uma das aplicações mais relevantes da ES, especialmente para espécies perenes com ciclos longos e remotas possibilidades de propagação vegetativa, como é o caso das palmeiras (MOURA *et al.*, 2009; MAZRI *et al.*, 2017; DU *et al.*, 2020; SILVA-CARDOSO *et al.*, 2019b). Além disso, essa técnica tem grande potencial para contribuir com programas de melhoramento genético e na conservação de germoplasma (PAIS, 2019; SIVANESAN *et al.*, 2022).

A indução da embriogênese somática representa o início de um processo específico de desenvolvimento, originando células e tecidos determinados para diferentes rotas morfogênicas (CHRISTIANSON; WARNICK, 1983). A indução pode ocorrer por situações de estresse e aplicação de fitorreguladores (NAMASIVAYAM *et al.*, 2007; ELHITI *et al.*, 2013). O estresse celular, provocado pelas condições adversas do ambiente *in vitro*, como injúrias no explante, é responsável pela aquisição de competência embriogênica, permitindo a transição somática para embriogênica (FEHÉR *et al.*, 2003; WÓJCIK *et al.*, 2020). Nesse sentido, a embriogênese somática é considerada uma resposta ao estresse em células vegetais cultivadas *in vitro* (PASTERNAK *et al.*, 2002; PRUDENTE *et al.*, 2019). Por isso, o monitoramento da atividade de enzimas antioxidantes, que controlam os produtos (ROS - espécies reativas ao oxigênio) do estresse oxidativo, pode auxiliar no entendimento dos aspectos preliminares do processo embriogênico de tecidos somáticos (BLAZQUEZ *et al.*, 2009).

Auxinas sintéticas como ácido diclorofenoxiacético (2,4D) podem induzir ES, principalmente por controlar a aquisição de competência embrionária (FEHÉR *et al.*, 2003, MIRONOVA *et al.*, 2017). Esse fitorregulador promove efeito duplo importante: desencadeia a produção de ácido indol-3-acético (AIA) endógeno e promove estresse celular, modulando a reprogramação das células via metilação do DNA nuclear. Tais efeitos são fundamentais, para garantir competência embriogênica às células, permitindo a transição somática para embriogênica (FÉRRER *et al.*, 2003; WÓJCIK *et al.* 2020; GARCIA *et al.*, 2022).

Outro fator importante para o crescimento e a morfogênese dos tecidos vegetais *in vitro* é o meio de cultura (SAHA *et al.*, 2010). Sua composição está relacionada a

processos metabólicos essenciais, como a indução de competência embriogênica, a formação e maturação de embriões somáticos, além de impactar o crescimento e a regeneração das plantas resultantes (SALAJ *et al.*, 2014; SAMSON *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2007; GREER *et al.*, 2009). Os meios de cultivos tradicionais têm proporcionado resultados inferiores na embriogênese somática em algumas espécies (DE CAMPOS *et al.*, 2020; FERREIRA *et al.*, 2022a), quando comparados aos meios que se baseiam na composição mineral da espécie em estudo (SAHA *et al.*, 2010; OBERSCHELP *et al.*, 2015; OBERSCHELP *et al.*, 2016). Isso tem levado à formulação de meios específicos e favorecido o sucesso do cultivo *in vitro* em alguns casos (OBERSCHELP *et al.*, 2016).

Estudos anatômicos são indispensáveis, para a caracterização de eventos relacionados à aquisição de competência e indução de embriogênese somática, como a identificação de estruturas embriogênicas (SILVA-CARDOSO, 2019a). A presença de centros meristemáticos é uma característica marcante de calos embriogênicos, denotando resposta à aplicação de fitormônios ao meio de cultivo (QUIROZ *et al.*, 2006; FEHÉR *et al.*, 2015). Em geral, as células de calos embriogênicos se distinguem dos não embriogênicos por serem pequenas, esféricas e agregadas, com elevada relação núcleo/citoplasma, contendo poucos e pequenos vacúolos, com organelas abundantes e as paredes celulares espessas (ALY *et al.*, 2002; BALZON *et al.*, 2013; SILVA CARDOSO *et al.*, 2019b; CAMPOS *et al.*, 2020). Calos embriogênicos de espécies de palmeiras já foram descritos como friáveis e de coloração clara e amarelo-acastanhados (MAZRI *et al.* 2018; MEIRA *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2021). Portanto, estudos morfoanatômicos são de grande importância na compreensão dos processos de ES, pois permitem diferenciar calos embriogênicos de não embriogênicos e descrever a estrutura de embriões somáticos (ZHANG *et al.*, 2021).

O coquinho azedo (*Butia capitata*) é uma palmeira endêmica do Cerrado na região central do Brasil. Valorizado na culinária local, seus frutos são comercializados principalmente por extrativistas, já que ainda inexistem pomares comerciais e pouco se conhece sobre o manejo dessa espécie (FARIA *et al.*, 2008). O extrativismo predatório, associado à expansão da fronteira agrícola do Cerrado, contribuiu para a inserção de *B. capitata* na lista de espécies ameaçadas (SILVA e SCARIOT, 2013; SIBBR, 2020). Isso justifica os esforços, para estudos de propagação vegetativa da espécie, por meio da embriogênese somática, os quais podem favorecer a formação de pomares comerciais uniformes, precoces e produtivos, atendendo os produtores locais e possibilitando a conservação dos maciços naturais.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência de injúrias mecânicas, meios de cultivo e reguladores de crescimento no processo inicial de embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de *B. capitata*.

4.1.2 MATERIAL E MÉTODOS

Experimento 1: Efeito do meio e da injúria na indução da embriogênese somática

4.1.2.1 Obtenção dos embriões zigóticos

Frutos de *B. capitata*, provenientes do Banco de Germoplasma do ICA/UFMG, Campus Montes Claros, Minas Gerais, Brasil, foram colhidos com coloração amarelo-alaranjada do exocarpo e derriçando naturalmente do cacho. Foram despoldados mecanicamente e secos à sombra por 15 dias. As sementes foram extraídas dos pirênios (unidade de dispersão: semente + endocarpo) com auxílio de um martelo. Em seguida, as sementes foram imersas em álcool 70% por 5 minutos e lavadas com detergente neutro e água corrente. Os embriões foram removidos cuidadosamente com bisturi e pinça e deixados imersos em água destilada por aproximadamente 2 horas. Na desinfestação dos embriões, utilizaram-se uma solução de hipoclorito de sódio a 1% e 0,5 mL L⁻¹ de Polisorbato 20 ® (Neon), por 15 minutos, seguida por três enxágues em água destilada e autoclavada.

4.1.2.2 Meios de cultura

Foram utilizados nos experimentos o meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e o meio COQ. O meio COQ foi elaborado seguindo a metodologia para a formulação de solução nutritiva em cultivos hidropônicos (MARTINEZ e CLEMENTE, 2011), com algumas adaptações. Amostras de duas inflorescências imaturas (aproximadamente 10 cm cada) e de folhas imaturas (palmito de aproximadamente 20 cm) de uma planta adulta foram utilizados para a realização de análise mineral em fevereiro de 2022 (Tabela 1).

Tabela 1- Conteúdo de macronutrientes (g/kg de matéria seca) e micronutrientes (mg/kg de matéria seca), presentes no palmito e inflorescência, coletados em fevereiro de 2022, em plantas de *B. capitata*, provenientes do Banco de Germoplasma do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA/UFMG), Campus Montes Claros, Minas Gerais, Brasil.

	Parâmetro	Palmito	Inflorescências
Macronutrientes	N	12,23	37,71
	P	1,43	4,74
	K	9,89	21,09
	Ca	1,28	11,78
	Mg	0,85	2,63
	S	0,68	2,97
Micronutrientes	B	70,0	12,89
	Zn	7,00	49,00
	Fe	51,20	59,00
	Mn	9,60	56,00
	Cu	5,80	12,63

O palmito foi seccionado a 20 cm do ápice da planta e as inflorescências imaturas foram destacadas de suas espatas (Figura 1). A retirada do palmito não atingiu o meristema apical da planta, que se regenerou completamente após quatro meses. A metodologia para a análise mineral seguiu a referência do Manual de Análises Químicas de Solos, Plantas e Fertilizantes (EMBRAPA, 2009).

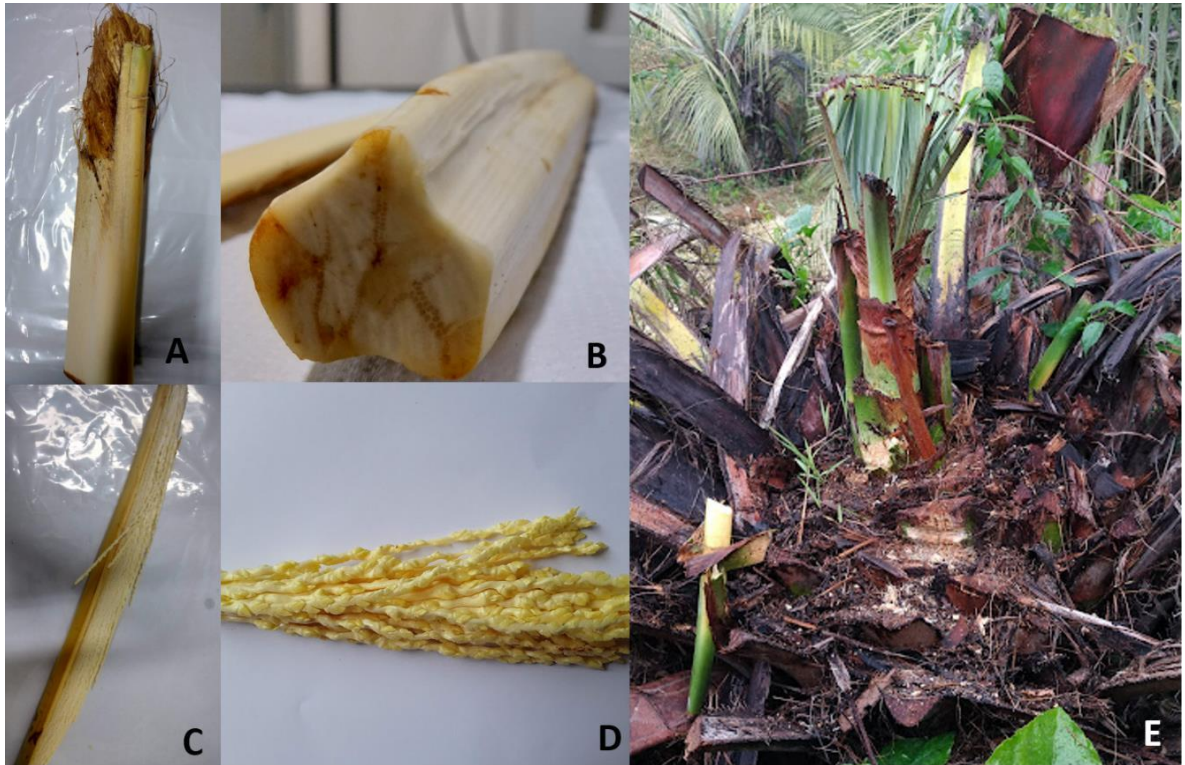


Figura 1- Palmito (A, B), inflorescências dentro da espata (C) e sem espata (D) e planta em processo de regeneração, após 40 dias da retirada do palmito, em *B. Capitata* (E).

Para o desenvolvimento do meio de cultivo basal COQ, tomou-se como referência a equação geral dos gases perfeitos. A pressão osmótica foi fixada em -0,8 atm (-81,06 Pa) para simular a pressão média do xilema de uma planta irrigada (FERREIRA *et al.*, 1992). A temperatura foi fixada em 28° C (temperatura de incubação *in vitro* adotada).

A equação geral dos gases perfeitos estabelece:

$$PV = nRT$$

Em que **P** é a pressão em atmosferas; **V** o volume em litros; **n** o número de mol de íons em solução; **R** a constante universal dos gases perfeitos (0,082 atm L/mol ° K), e **T** a temperatura em graus kelvin (T °C+ 273), logo:

$$0,8 \text{ atm} * 1\text{L} = (n * 0,082 \text{ atmL} / \text{mol. K}) * (28 + 273)$$

$$= 0,032412 \text{ mol/L ou } 32,41 \text{ m mol/L}$$

Assim, tomou-se como ideal a quantidade de íons por litro de solução 32,41 m mol, bem como conteúdo referência de nutrientes presentes no palmito e inflorescências de *B. capitata*. Entretanto, para essa concentração de íons, foram considerados somente os macronutrientes, uma vez que os micronutrientes pouco alteram o potencial osmótico

da solução. Verificando que os nutrientes N, P, K, Ca, Mg e S são absorvidos na forma de íons específicos, sendo os principais, respectivamente, NO_3^- (nitrato), H_2PO_4^- (fosfato), K^+ (potássio), Ca^{++} (cálcio), Mg^{++} (magnésio) e S-SO_4^- (sulfato), cada valor do nutriente no tecido vegetal foi multiplicado pelo valor total de íons na solução ($32,41 \text{ m mol.L}^{-1}$) e dividido pelo valor total dos íons no palmito ou inflorescência (Tabela 2). Os dados de conteúdo de nutrientes no tecido vegetal foram transformados em $\text{mg}/100 \text{ g}$ de matéria seca e depois para m mol.L^{-1}

Tabela 2- Concentração de íons na solução para a elaboração do meio de cultivo (COQ) para *B. capitata*

Nutriente (<i>m mol/L</i>)	N- NO_3^-	P- H_2PO_4^-	K- K^+	Ca- Ca^{++}	Mg- Mg^{++}	S- SO_4^-	TOTAL
Palmito	22,435	1,1847	6,5128	0,8218	0,9095	0,5457	32,41
Inflorescência	22,475	1,2758	4,5122	2,4573	0,9143	0,7744	32,41

Posteriormente foi realizado o balanceamento de iônico. Foi observado excesso de ânions para o palmito e inflorescências. Por isso, optou-se por distribuir a fonte de N entre 3:1 de NO_3^- e NH_4^+ . Ainda assim, foi necessário adicionar NaNO_3^- para atingir o equilíbrio iônico. A partir dessa etapa, optou-se por utilizar a média dos valores calculados para o palmito e inflorescências e, assim, formular um meio de cultivo base para quaisquer explantes utilizados, sejam vegetativos ou reprodutivos (Tabela 3).

Tabela 3- Concentração média de íons para a produção de meio de cultivo de *B. capitata*

Nutriente (<i>m mol/L</i>)	N- NO_3^-	P- H_2PO_4^-	N- NH_4^+	K- K^+	Ca- Ca^{++}	Mg- Mg^{++}	S- SO_4^-	TOTAL
Média	16,8416	1,23025	5,61385	5,5125	1,63955	0,9119	0,66005	32,41

Assim, foram determinadas as fontes e as concentrações de macronutrientes para compor o meio COQ (Tabela 4).

Tabela 4- Fonte e concentração de macronutrientes para a produção de meio de cultivo de *B. capitata* (COQ)

Fonte	Necessidade m mol/L	Peso molecular	Valor em mg/L
MgSO ₄	0,66005	246,48	162,6891
MgCl ₂	0,1936	203,30	39,35888
KH ₂ PO ₄	1,23025	136,086	167,4198
Ca (NO ₃) ₂	1,63955	236,15	387,1797
KNO ₃	4,28225	101,10	432,9355
NH ₄ NO ₃	5,61385	80,043	449,3494
NaNO ₃	3,6664	69,00	252,9816

Os micronutrientes foram determinados, a partir de valores médios da análise dos tecidos foliares, estabelecendo a sua fonte e sua concentração (Tabela 5). As fontes de cloro e níquel não foram incluídas, uma vez que esses elementos, geralmente, são contaminantes de outros sais comerciais adicionados ao meio, o que supre a sua necessidade. O ferro foi fornecido, por meio da quelatização de sulfato de ferro com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), visando aumentar a estabilidade da fonte de ferro ao longo do cultivo *in vitro*.

Tabela 5: Fonte e concentração de micronutrientes para a produção de meio de cultivo de *B. capitata* (COQ).

Fonte	Necessidade m mol/L	Peso Molecular	Valor em mg/L
B- H ₃ BO ₃	0,3837	61,83	23,72417
Zn- ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0428	287,54	12,30671
Mn- MnSO ₄ .H ₂ O	0,0597	169,01	10,0899
Cu- CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0145	249,68	3,62036
Ferro- FeSO ₄	0,0987	278,01	27,43958
NaEDTA	0,0987	292,24	28,84408

Além dos nutrientes, os meios de cultivo dos experimentos (MS e COQ) foram suplementados com 30 g L⁻¹ sacarose; 1,0 mg L⁻¹ de ácido nicotínico, piridoxina, tiamina e glicina e 0,1 g L⁻¹ de inositol, arginina, asparagina, glutamina; 1 g L⁻¹ de caseína; 2,5 g L⁻¹ de Phytigel® (Sigma, USA). O pH dos meios de cultivo foram ajustados para 5,7 ± 0,1 e autoclavados por 15 minutos a 121 °C e 1,5 atm.

4.1.2.3 Instalação e condução do experimento

Os meios de cultura, no volume de 5 ml, foram distribuídos em tubos de ensaio (12 x 75 mm). Embriões injuriados e não injuriados (Figuras 2 A, B, C), um por tubo, foram inoculados nos meios de cultivo. As injúrias aplicadas foram de dois tipos: uma denominada esmagamento, realizada por meio de uma compressão transversal, ao longo do embrião, com o auxílio de uma pinça e, outra feita com bisturi seccionando a região mediana transversal do embrião (Figuras 2 A, B). Após a inoculação, os tubos de ensaio foram acondicionados, em Biochemical Oxygen Demand (BOD), à temperatura de 28 °C e na ausência de luz. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 (meios de cultivo) X 3 (embriões com dois tipos de injúrias ou intactos), com quatro repetições e quatro tubos de ensaio por parcela.

Aos 10 e 50 dias após a inoculação, foram avaliadas as seguintes características: oxidação, quando os explantes apresentaram pelo menos 50% do tecido escurecido; alongamento do pecíolo cotiledonar, embriões que possuíam um aumento de 2 mm no comprimento do pecíolo cotiledonar; presença da parte aérea, emissão da primeira bainha foliar; formação de calos com pelo menos uma estrutura globular e de calos com estrutura irregular.

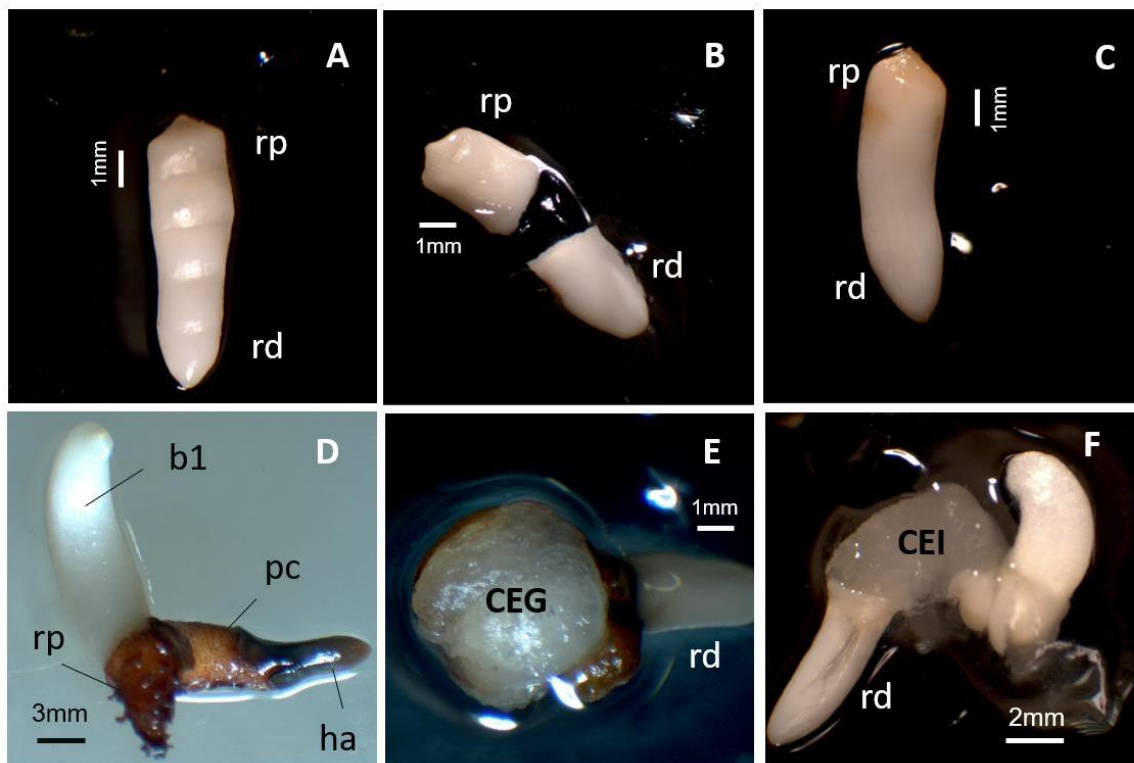


Figura 2- Embriões zigóticos de *B. capitata* submetidos ao esmagamento (A), seccionamento transversal (B), embrião intacto (C) e cultivados em *in vitro*, apresentando a primeira bainha foliar

(D), calo estrutura globular (E) e irregular (F). b1, primeira bainha; CEI, calo com estrutura irregular; CEG, calo com estrutura globular; ha, haustório; pc, pecíolo cotiledonar; rp, -região proximal do embrião (origem pecíolo cotiledonar); rd, região distal do embrião (origem haustório).

4.1.2.4 Atividade de enzimas do sistema antioxidante

O experimento foi repetido nas mesmas condições para a realização da avaliação do sistema antioxidante. Antes e 50 dias após a inoculação do explante em meio de cultura, embriões de cada tratamento foram congelados em nitrogênio líquido e armazenadas para a análise da atividade de enzimas do estresse oxidativo. Foram determinadas as atividades das enzimas catalase (CAT), peroxidases (POX) e superóxido dismutase (SOD). Utilizaram-se, para cada tratamento e enzima, três repetições de 100 mg de material vegetal fresco. O material foi submetido à homogeneização de 1 mL do meio de extração (tampão de fosfato de potássio 0,1 M e pH 6,8; contendo ácido etilenodiaminotetracético 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonil 1 mM e polivinilpirrolidona 1% (p/v) (PEIXOTO *et al.*, 1999). A mistura foi centrifugada a 12.000 xg, durante 15 min, a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado como extrato enzimático.

A atividade da CAT foi determinada, medindo-se o decréscimo na absorbância, no primeiro minuto de reação a 240 nm, a 30 °C e está calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (ANDERSON *et al.*, 1995) e os resultados expressos em $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína. A POX foi medida no incremento da absorbância, durante o primeiro minuto de reação a 420 nm, a 25°C, sendo a atividade calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (CHANCE e MAEHLEY, 1955) e os resultados expressos em $\mu\text{mol de purpurogalina min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína. Já a SOD foi a 25 °C, em câmara de reação sob iluminação por 5 min e medida a 560 nm. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotoredução do NBT e os resultados foram expressos em $\text{U min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína (BEAUCHAMP E FRIDOVICH, 1971).

4.1.2.5 Avaliação anatômica

O experimento foi repetido nas mesmas condições para a realização da avaliação anatômica. Três embriões de cada tratamento foram coletados e processados para a avaliação em microscopia de luz aos 0, 10, 15, 30 e 50 dias após a inoculação. Os embriões foram fixados em FAA 70 (formaldeído: ácido acético: álcool 70% na proporção

1:1:18) por 24 horas, com passagem em vácuo utilizando uma seringa por um minuto e estocados em álcool 70% até serem desidratados. Para desidratação, utilizaram-se passagens de duas horas de cada material em álcool 96, 90, 80 e 70% (NEVA, 1958). Os materiais foram incluídos em metacrilato, seguindo a metodologia proposta por PAIVA et al. (2011). Cortes transversais e longitudinais (5 - 6 μm) foram obtidos em micrótomo rotativo e corados com azul de toluidina 0,05%, em pH 6,8 (FEDER e O'BRIEN, 1968) e montados entre lâmina e lamínula com resina (Entellan®). As fotomicrografias foram obtidas em microscópio óptico Zeiss Stemi 2000-C e estereomicroscópio Primo Star Zeiss, ambos com câmera digital Cannon A-650/S, acoplada.

Experimento 2: Efeito de reguladores de crescimento na indução da embriogênese somática

4.1.2.6 Instalação e condução do experimento

Este estudo foi desenvolvido nas mesmas condições do anterior, utilizando processo idêntico para a obtenção de embriões e do meio de cultura COQ. Os embriões foram inoculados (intactos) e cultivados em ambiente de BOD, conforme descrito acima.

4.1.2.7 Indução da calogênese e Multiplicação de calos

O meio de cultura COQ, acrescido do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e do ácido 4 – Amino 3,5,6 triclóropicolínico (picloram), no volume de 10 ml, foi disposto em placas de petri de dimensões de 12 x 75 mm. Utilizaram-se no meio ambos os reguladores de crescimento, nas dosagens que variaram de 50 e 300 μM , com base em testes preliminares. As placas foram inoculadas cada uma com oito embriões e acondicionadas em Biochemical Oxygen Demand (BOD), como já mencionado. Os tratamentos foram constituídos pelas seguintes dosagens dos reguladores de crescimento: T1-50 μM de 2,4-D + 300 μM de Picloram, T2- 300 μM de 2,4-D + 50 μM de Picloram, T3- 300 μM de 2,4-D e T4- 300 μM de Picloram. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos, 10 repetições e oito embriões por parcela.

Aos 15 dias após a inoculação, avaliou-se o número total de calos primários formados, enquanto, aos 45 dias, o número de calos de aspecto embriogênico, friável e contendo estruturas globulares. Nesse período, os calos foram transferidos para meio de

cultura previamente testados com o objetivo de multiplicação e diferenciação de embriões. O meio continha formulação basal COQ, acrescido de 0,5 μM de Picloram + 0,25 μM de N6-(delta 2-Isopentenyl)-adenina (2ip). A cada 30 dias os calos eram subcultivados no mesmo meio de cultivo.

4.1.2.8 Perfil Hormonal

Antes da inoculação (embriões) e 45 dias após a inoculação, amostras em triplicata de 1 g cada foram congeladas em nitrogênio líquido e, posteriormente, submetidas à análise de perfil hormonal. As amostras permaneceram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a análise. Foram utilizados calos considerados embriogênicos (aspecto friável e contendo estruturas globulares) e calos não embriogênicos (compactos com ausência de estruturas globulares). Os metabólitos foram extraídos dos embriões e dos calos utilizando metodologia adaptada de COUTINHO *et al.*, 2019 e LIMA *et al.*, 2019. O material para análise (0,1 g) foi adicionado a 400 μL de solventes de extração, composto pelos reagentes na seguinte proporção: 20 de metanol: 79 de álcool isopropil: 1 ácido acético (v:v:v). As amostras foram misturadas em vórtex quatro vezes por 20 segundos (mantidas em gelo), sonificadas por 10 minutos, colocadas em gelo por 30 minutos e, em seguida, centrifugadas a 13.000 g por 10 minutos a 4°C . Logo após, 350 μL do sobrenadante foram removidos e transferidos para um novo tubo. O processo foi repetido com o pellet resultante e, depois, os sobrenadantes foram agrupados. Aproximadamente 600 μL dos extratos foram colocados em frascos e 5,0 μL foram injetados no sistema LC/MS da NuBioMol (Centro de Análise de Biomoléculas-UFV, Brasil), utilizando uma coluna de cromatografia (Agilent Eclipse Plus, RRHD, 1,8 μm , 2,1 x 150 mm) com fluxo de 0,25 mL/min, acoplada online a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo QQQ (Agilent). A fase móvel foi composta pelos tampões A (água com 0,02% de ácido acético) e B (acetonitrila com 0,02% de ácido acético), utilizando o seguinte programa de gradiente: rampa linear começando em 2%, aumentando até 20% em 8 minutos, aumentando para 40% em 15 minutos e para 98% em 18 minutos. Em seguida, foi mantido a 98%, durante 3 minutos (totalizando 21 minutos) e um gradiente linear descendente foi iniciado, reduzindo de 98% para 2% em 1 minuto (totalizando 22 minutos), seguido por uma condição de equilíbrio a 2% por 3 minutos (totalizando 25 minutos). O espectrômetro de massa foi operado nos modos alternados negativo e positivo, e as amostras foram escaneadas por monitoramento de reações múltiplas (MRM). Os testes foram realizados com três réplicas

biológicas. Os espectros de massa gerados foram processados, utilizando o software Skyline, para obter os cromatogramas de íons extraídos (XIC) de cada transição e os valores de área, como indicativos da abundância de cada hormônio vegetal.

4.1.2.9 Avaliação Anatômica

Três amostras para tratamento do início da formação dos calos (15 dias) e após 45 dias foram coletadas para estudos anatômicos. Aos 100 dias de cultivo, também, foi avaliada uma estrutura semelhante a um embrião somático. A metodologia de preparo das amostras para a avaliação anatômica seguiu o mesmo procedimento do Experimento 1 citado anteriormente.

4.1.2.10 Análises estatísticas

A verificação da normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias foram feitas pelo teste Shapiro-Wilk e Barlett. Os dados do experimento I foram submetidos à transformação de dados pelo modelo raiz quadrada de $(y + 0,5)$ e à análise de Componentes Principais. Os resultados de ambos os experimentos foram submetidos à análise de variância e ao teste de comparação de médias de Tukey ($P < 0,05$). Utilizou-se para as análises o software R versão 4.1.3.

4.1.3 RESULTADOS

Experimento 1: Efeito do meio e da injúria na indução da embriogênese somática

4.1.3.1 Oxidação, germinação e formação de calos

A oxidação aparente dos embriões foi menor para os embriões cultivados no meio MS (0,58), em comparação ao COQ (1,10), aos 10 dias de inoculação (Tabela 6). Nessa mesma época, não houve efeito isolado da injúria e nem da interação injúria e meio. Aos 50 dias pós-inoculação, nenhum fator isolado ou sua interação influenciou essa variável, apresentando um valor médio de 1,37 embriões oxidados.

Tabela 6- Número de embriões que apresentaram oxidação aparente (OXI), alongamento do pecíolo cotiledonar (PC), presença da parte aérea (PA) e formação de calos com pelo menos uma estrutura globular (CEG) de embriões de *B. capitata*, injuriados (ESM-esmagamento, SEC-seccionamento, AI-ausência de injúria), cultivados em meio MS e COQ e avaliados após 10 e 50 dias após a inoculação (D.A.I).

10 dias após inoculação									
Variáveis	OXI*			PC*					
Tratamentos	MS	COQ	Média Injúria	MS	COQ	Média Injúria			
ESM	0,75	1,00	0,87	1,45	0,75	1,10 ab			
SEC	0,50	1,45	0,97	0,75	0,75	0,75 b			
AI	0,50	0,85	0,67	1,86	1,68	1,77 a			
Média Meio	0,58 B	1,10 A		1,35	1,06				
CV (%)	59,80			56,9					
50 dias após inoculação									
Tratamentos	PC*			PA*			CEG*		
	MS	COQ	Média Injúria	MS	COQ	Média Injúria	MS	COQ	Média Injúria
ESM	1,45	1,20	1,33 b	1,35	0,50	0,92 ab	1,20	1,20	0,85 ab
SEC	1,10	0,75	0,92 b	0,50	0,50	0,50 b	1,70	1,70	1,22 a
AI	2,11	2,25	2,18 a	1,28	1,10	1,19 a	0,50	0,50	0,50 b
Média Meio	1,55	1,40		1,05	0,70		0,58 B	1,13 A	
CV (%)	41,91			61,23			46,81		

*significativo a 5% de probabilidade. Letras minúsculas idênticas nas colunas e nas linhas não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo Teste Tukey. Os dados foram submetidos à transformação de dados pelo modelo raiz quadrada de $(y + 0,5)$ e posteriormente submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias de Tukey ($P < 0,05$). A verificação da normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias foram feitas pelo teste Shapiro-Wilk e Barlett.

A detecção do alongamento do pecíolo cotiledonar (Figura 2D) foi superior, quando não se realizou a injúria (Tabela 6), atingindo, em média, aos 10 e 50 dias após inoculação, respectivamente, 1,77 e 2,18. Independente da época de avaliação, o número de embriões que apresentaram alongamento do pecíolo cotiledonar não variou em função do meio, sendo aos 10 dias, em média, de 1,20 e aos 50 dias de 1,47. A presença de parte aérea das plântulas, caracterizada pelo crescimento da primeira bainha (Figura 2D), foi significativa apenas para o tipo de injúria, aos 50 dias após inoculação, com comportamento inferior na seção do embrião em relação ao tratamento de ausência de injúria (Tabela 6). O meio e tipo de injúria, aos 10 dias pós-inoculação, e, meio aos 50 dias, não alteraram a presença da bainha nas plântulas.

Os calos com estrutura globular (Figura 2E) se formaram, a partir dos 10 dias de inoculação, porém somente aos 50 dias houve efeito isolado do meio e do tipo de injúria (Tabela 6). Calos com estrutura globular foram mais numerosos no meio COQ (1,13), sendo o tratamento de secção do embrião superior à ausência de injúria. Para calos com estrutura irregular (Figura 2F), não houve efeito de nenhum fator isolado ou da sua interação. Aos 10 dias após inoculação, foram obtidos, em média, 0,64 de embriões com calos irregulares, enquanto, aos 50 dias, 0,93.

Os dois primeiros Componentes Principais (CP) explicaram pelo menos 80% da variação dos dados, logo demonstra boa representação da dispersão dos escores dos CP no plano bidimensional (Figura 3) (CRUZ *et al.*, 2020). As variáveis mais correlacionadas com o primeiro componente principal foram calo com estrutura globular, aos 50 dias pós-incubação e presença de parte aérea aos 10 e 50 dias, enquanto, no segundo componente, foi calo com estrutura irregular aos 10 dias pós-incubação.

O meio COQ e a injúria proporcionaram a maior formação de calos com estrutura globular. Além disso, a presença desses calos associou-se à oxidação, especialmente nos primeiros dez dias de cultivo (Figura 3). Já a utilização do meio MS com injúria estava mais correlacionada com a formação de calos com estrutura irregular. Adicionalmente, a ausência de injúria promoveu maior ocorrência de estruturas indicativas da germinação, como emissão de pecíolo cotiledonar e formação da parte aérea. Por outro lado, a presença dessas estruturas se correlacionou negativamente com a formação de calos, sendo processos antagônicos (Figura 3).

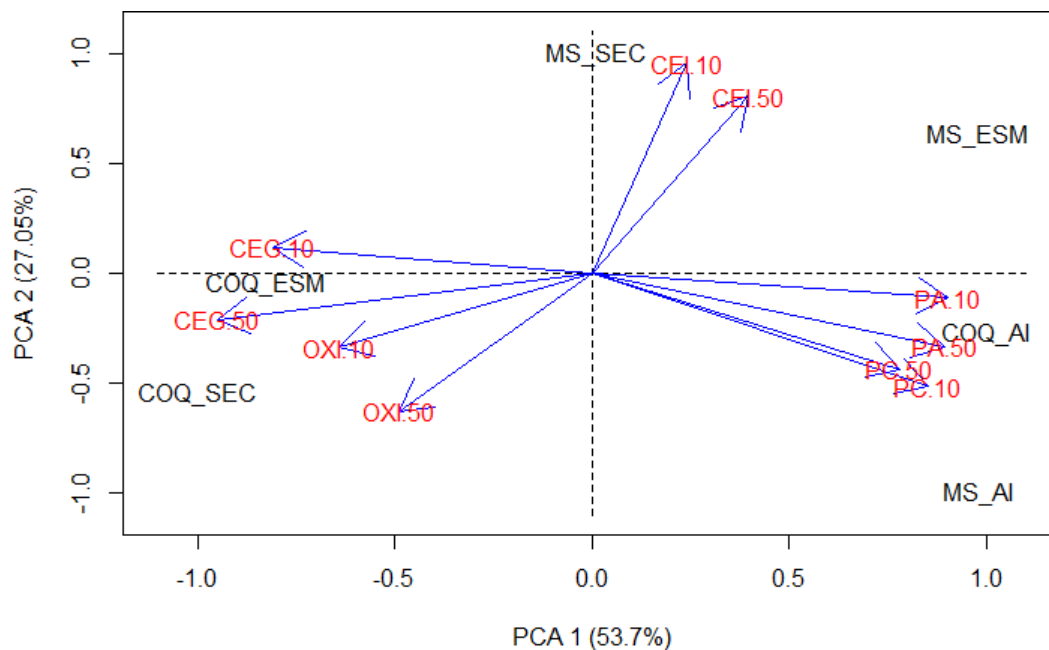


Figura 3 – Dispersão gráfica dos dois primeiros Componentes principais (CP) para as variáveis estudadas. MS_ESM (meio MS e injúria de esmagamento), MS_SEC (meio MS e injúria de seccionamento), MS_AI (meio MS e ausência de injúria), COQ_ESM (meio coquinho (COQ) e injúria de esmagamento), COQ_SEC (meio coquinho (COQ) e injúria de seccionamento), COQ_AI (meio coquinho (COQ) e ausência de injúria). OXI_50 (número de explantes oxidados aos 50 dias de cultivo), PC.10 (número de explantes com alongamento do pecíolo cotiledonar aos 10 dias de cultivo), PC.50 (número de explantes com alongamento do pecíolo cotiledonar aos 50 dias de cultivo), PA.10 (número de explantes com presença da primeira bainha, parte aérea aos 10 dias de cultivo), PA.50 (número de explantes com presença da primeira bainha,

parte aérea aos 50 dias de cultivo), CEI.10 (número de explantes com formação de calos com estrutura irregular aos 10 dias de cultivo), CEI.50 (número de explantes com formação de calos com estrutura irregular aos 50 dias de cultivo), CEG.10 (número de explantes com formação de calos com estrutura globular aos 10 dias de cultivo), CEG.50 (número de explantes com formação de calos com estrutura globular aos 50 dias de cultivo).4.1.3.2 Atividade de enzimas do sistema antioxidante

A atividade da enzima catalase não foi influenciada pelo meio, mas foi maior quando os embriões foram esmagados em relação aos demais tratamentos. Já para a enzima peroxidase, houve efeito significativo do fator injúria e meio de cultivo, com maior atividade enzimática no meio COQ e no esmagamento do embrião e na ausência de injúria. A atividade de superóxido dismutase não foi influenciada por nenhum dos tratamentos (Tabela 7).

Tabela 7- Atividade das enzimas catalase e peroxidase, em embriões de *B. capitata*, injuriados (ESM-esmagamento, SEC-seccionamento, AI-ausência de injúria), cultivados em meio MS e COQ e avaliados após 50 dias após a inoculação. Catalase (CAT) $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ mg ptnas}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Peroxidases (POX) $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ mg ptnas}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Injúrias	CAT		Média Injúrias	POX		Média Injúrias
	MS	COQ		MS	COQ	
ESM	9,12	8,39	8,76 a	3,52	4,32	3,92 a
SEC	4,98	3,83	4,41 b	3,13	3,39	3,26 b
AI	3,92	4,76	4,34 b	3,58	4,21	3,89 a
CV (%)	14,09			11,17		
Média (Meio)	5,66	6,01		3,41 B	3,97 A	
F(A:Meio)	0,79 ns				8,40*	
F(B:Injúrias)	56,76**				4,97 *	
F(AxB)	2,43 ns				0,66 ns	

*significativo a 5% de probabilidade pelo teste F, ** significativo a 1% de probabilidade pelo teste F, ^{ns} não significativo. Letras minúsculas idênticas nas colunas e nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

4.1.3.2 Morfoanatomia

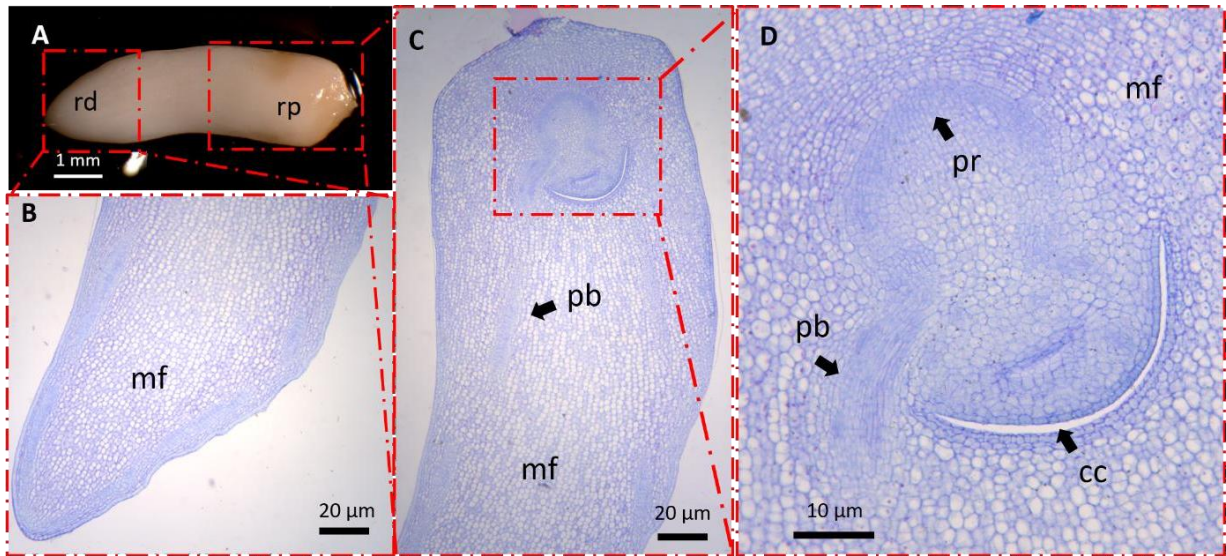


Figura 4- Aspectos morfológicos e anatômicos do embrião de coquinho azedo (*Butia capitata*) não inoculado. Em A, região proximal (rp) e região distal (rd). Em B, corte anatômico da região distal. Em C corte anatômico da região proximal, mostrando o eixo embrionário. Em D detalhe do eixo embrionário, destacando o pró-meristema radicular (pr), pró-câmbrio (pb) e cavidade cotiledonar (cc). rd- região distal, rp- região proximal, pr- pro-meristema radicular, cc- cavidade cotiledonar, mf-meristema fundamental, pb-procâmbio.

O embrião de *B. capitata* possui um único cotilédone de formato cônico de aproximadamente 3,5 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro (Figura 4A). A porção mais afilada corresponde à região distal, onde o haustório desenvolve-se após o processo de germinação (Figura 4B). A porção de maior diâmetro corresponde à região proximal, em que está inserido o eixo embrionário (Figura 4C, D), que é curvo, oblíquo, em relação ao eixo do cotilédone, com a presença do hypocótilo-radícula próximo à cavidade cotiledonar (Figura 4D). As células do meristema fundamental são volumosas e globulares, sendo maiores na região central e na região distal do cotilédone, em relação às células localizadas na porção proximal e mais periféricamente. As células procambiais são estreitas e alongadas no sentido longitudinal (Figura 4 D).

4.1.3.3 Após 10 dias de cultivo *in vitro*

Os calos, nos dois meios de cultivo, independente do tratamento de injúria, formaram-se na região proximal do embrião. No meio MS, os calos apresentaram coloração leitosa e estrutura mais irregular (Figuras 5A e 5E), enquanto os do COQ, predominantemente, creme-amarelada e de formato mais globular (Figuras 5H e 5K). O

calo, cultivado no meio MS, de embrião que sofreu secção e, aos 10 dias pós-incubação (Figura 5A, B, C, D), apresentou formato estrutural irregular e de coloração translúcida (Figura 5B). Detectou-se presença de protoderme evidente, envolvendo células arredondadas, paredes espessas e vacúolos grandes, além de um sistema vascular em desenvolvimento (Figuras 5B, C), sendo possível identificar elementos traqueais. Feixes vasculares também estavam presentes na região paralela e transversalmente à superfície do explante, região de origem dos calos. O calo formado, no seu interior, em meio MS e embrião esmagado (Figuras 5E, F, G), apresentou células predominantemente alongadas, contendo vacúolos proeminentes. As divisões celulares indicam que o sentido das divisões partiu da região proximal para a região distal do embrião (Figura 5G). Foi possível visualizar aumento e alongamento da bainha foliar, envolvendo a cavidade cotiledonar (Figura 5F).

No calo formado no meio COQ e com secção do embrião, também, notou-se que a região distal não sofreu qualquer mudança morfológica até os 10 dias de cultivo (Figura 5H). Esse calo possuía formato globular, porém com aspecto mais friável que os outros. As células que envolvem os calos também apresentaram padrões distintos. As regiões mais externas da cavidade cotiledonar continham células alongadas, com vacúolos proeminentes e espaços intercelulares (Figura 5I). Próximo à cavidade cotiledonar, as células eram menores, arredondadas, com núcleos proeminentes e citoplasma densos (Figura 5J). A origem da formação de calos foi em pontos distintos de células próximas à cavidade cotiledonar, sendo possível verificar alguns centros meristemáticos próximos ao ponto de corte do embrião (Figura 5I). A protoderme foi identificada envolvendo o calo, o qual possuía células grandes e vacuoladas e espaços intercelulares (Figura 5I). Na cavidade cotiledonar, foi observada multiplicação de células com núcleo evidente e citoplasma denso, indicando células com potencial embriogênico (Figura 5J). A região distal também não sofreu qualquer alteração que indicasse desenvolvimento do haustório.

Os calos formados em meio COQ também surgiram na região proximal do embrião zigótico (Figuras 5 K, L, M). Esses calos apresentaram células de padrões distintos: algumas de tamanho pequeno e alta densidade citoplasmática próximas à cavidade cotiledonar e outras grandes, alongadas ou arredondadas com vacúolos proeminentes e espaços intercelulares (Figura 5L). Foram identificadas, próximas à cavidade cotiledonar, células com núcleos proeminentes e citoplasma denso, rodeadas

por células em colapso (seta preta- Figura 5M), sugerindo isolamento de células com características embriogênicas.

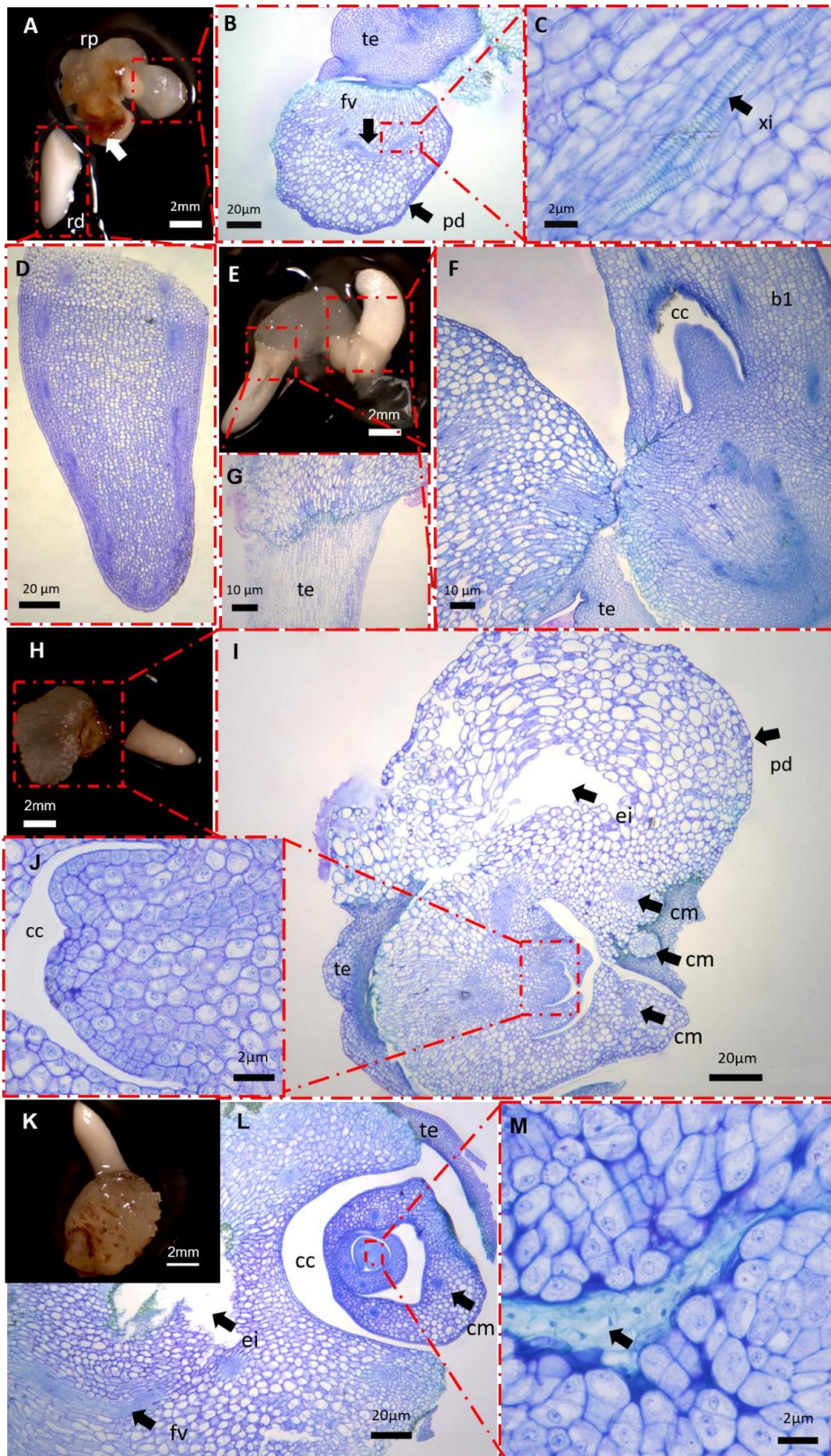


Figura 5- Calos e estruturas calosas formadas em 10 dias de cultivo. Em A, B, C, D calo originário de MS/SEC. Em B seta preta indicada por (fv) mostra formação de feixes vasculares. Em C seta preta indica formação de elementos traqueais, contendo células características do xilema. Em E e F calo formado em MS/ESM. Em H e I calo formado em COQ/SEC e em K, L, M calo formado em COQ/ESM. Em I setas pretas indicadas por (ei) mostram espaços intercelulares, setas pretas indicadas por (cm) indicam centros meristemáticos e setas pretas indicadas por (pd) indicam formação de protoderme. rd- região distal, rp- região proximal, te- tecido remanescente do explante, pd- protoderme, ei- espaços intercelulares, fv- feixes vasculares, xi- células características do xilema, b1- primeira bainha, cc- cavidade cotiledonar, cm- centro meristemático.

4.1.3.4 Após 15 dias de cultivo *in vitro*

Os calos avaliados no meio MS, sob injúria de esmagamento, apresentaram estruturas mais irregulares comparadas às originárias do meio COQ. Em ambos os meios, os calos foram formados na região proximal do embrião zigótico (Figura 6 H, I, J, K), com células grandes, vacuoladas e majoritariamente alongadas (Figura 7I). Um dos calos avaliados nesse tratamento apresentou estrutura mais alongada, (Figuras 6J, K), com indícios de que se tratava da formação de um pecíolo cotiledonar, em função da expansão das células da cavidade cotiledonar, o que culmina com o início do desenvolvimento das bainhas (Figura 6K). Foi possível observar vários centros de divisão celular próximos ao eixo embrionário, indicando elevada atividade meristemática (setas-pretas Figura 6K).

Os calos presentes no meio COQ, sob injúria de esmagamento, apresentaram estruturas calosas isoladas entre si (Figuras 6 A, E). O primeiro calo avaliado desse tratamento evoluiu para a região do eixo embrionário com células pequenas, esféricas, citoplasma denso (Figura 6B) e espaços intercelulares. Não houve crescimento do eixo vegetativo. No entanto, próximo ao eixo embrionário, centros meristemáticos foram observados (setas pretas- Figura 6 D), com células grandes, alongadas, vacuoladas e envolvidas por uma protoderme definida (Figuras 6 B, C). A segunda estrutura calosa desse mesmo calo (Figura 6C), aparentemente formado posteriormente, continha células mais alongadas e vacuoladas. Outro calo formado no meio COQ, sob injúria ESM, apresentou pelo menos três estruturas globulares, sendo que uma delas isolou-se por meio de uma protoderme (Figura 6 E, F, G). Essa estrutura era composta por células grandes, alongadas e feixes vasculares em desenvolvimento, com células características de protoxilema (Figura 6G).

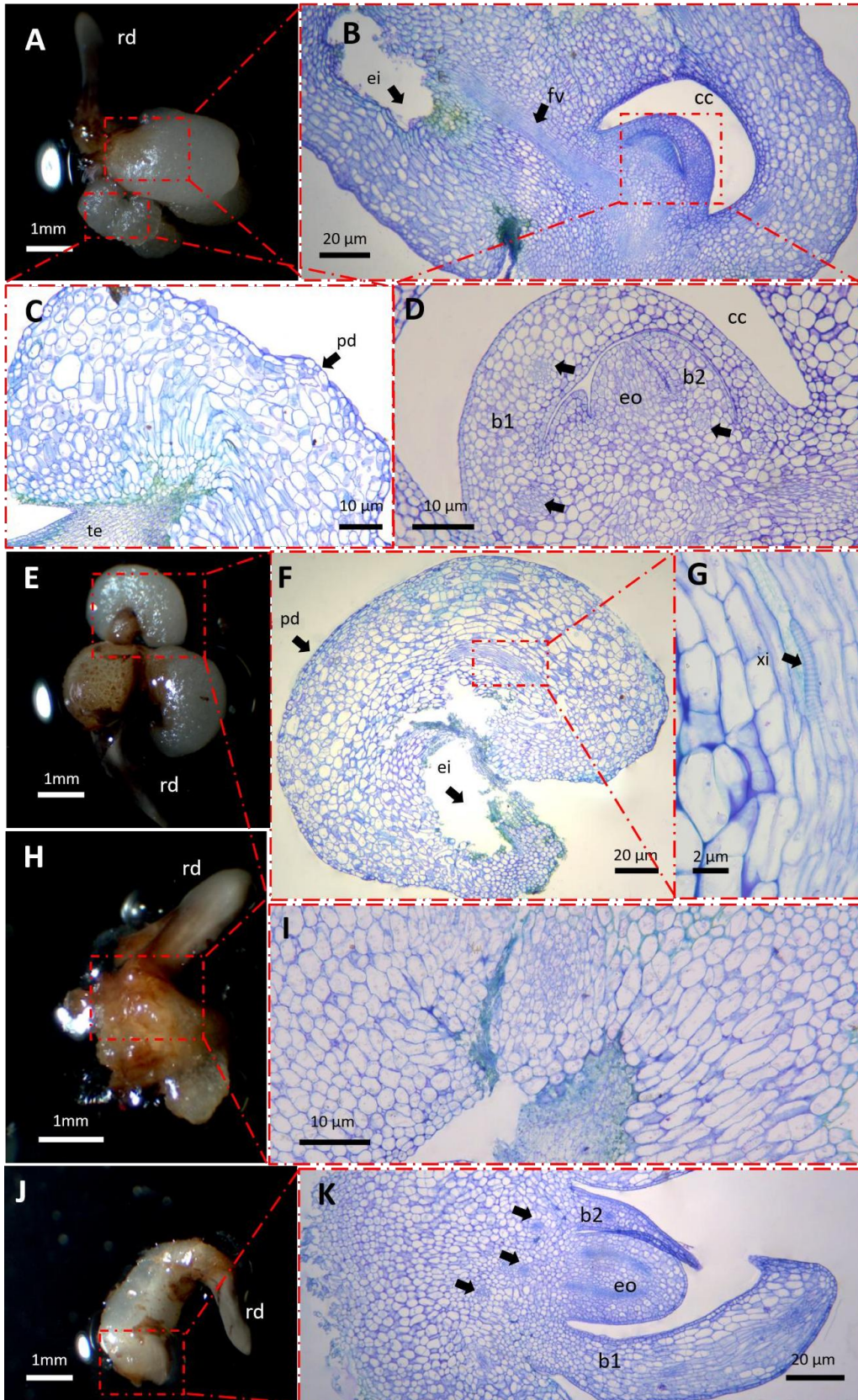


Figura 6- Calos formados no tratamento meio COQ sob injúria ESM (A, B, C, D, E, F, G) e meio MS sob injúria ESM (H, I, J, K) aos 15 dias de cultivo. Em B e F setas pretas indicadas por (ei) mostram espaços intercelulares. Em B seta preta indicada por (fv) mostra formação de feixes vasculares. Em C e F setas pretas indicadas por (pd) mostram formação de protoderme. Em G seta preta indica formação de elementos traqueais, contendo células características do xilema.

Em K setas pretas indicam centros meristemáticos. rd- região distal, ei- espaço intercelular, te- tecido do embrião, fv- feixe vascular, cc- cavidade cotiledonar, eo- eófilo 1, b1- bainha 1, b2- bainha 2, pd- protoderme, xi- protoxilema.

4.1.3.5 Após 30 dias de cultivo *in vitro*

Os calos presentes no tratamento do meio MS e de esmagamento (MS/ESM) do embrião apresentaram características distintas. Foram identificadas pelos menos quatro estruturas arredondadas em um dos calos (Figura 7 E), em algumas partes compostas por células alongadas e vacúolos proeminentes, enquanto, em outras células redondas, pouco vacuoladas e de alta densidade citoplasmática, porém todas as estruturas envoltas por uma aparente protoderme (Figura 7 F). Outros calos oriundos do tratamento MS/ESM apresentaram estrutura germinativa, uma vez que foi identificado o desenvolvimento das bainhas foliares (Figura 7H), porém sem o desenvolvimento de um haustório funcional. Na região distal do embrião (Figura 7I), mesmo com os danos do esmagamento, não houve proliferação celular.

Os calos oriundos do tratamento COQ e esmagamento do embrião formaram-se na região proximal do embrião zigótico. A região distal apresentou elevada oxidação (Figuras 7 A, B, C, D). Os calos apresentaram, majoritariamente, células grandes, alongadas e vacuoladas (Figura 7B). Estruturas esféricas foram identificadas (Figuras 7 B, C), com conexão tênue com calos e presença de um envoltório semelhante a uma protoderme. Na parte basal do calo, foram verificadas células pequenas, esféricas, com paredes espessas, citoplasma denso e núcleos bem evidentes (Figura 7C). Na região central, foi evidente uma zona meristemática, com células que aparentemente estavam formando um sistema vascular independente (Figura 7C). Nesse calo, evidências do alongamento do pecíolo cotiledonar ao serem observadas estruturas como o eófilo e bainha (Figura 7D).

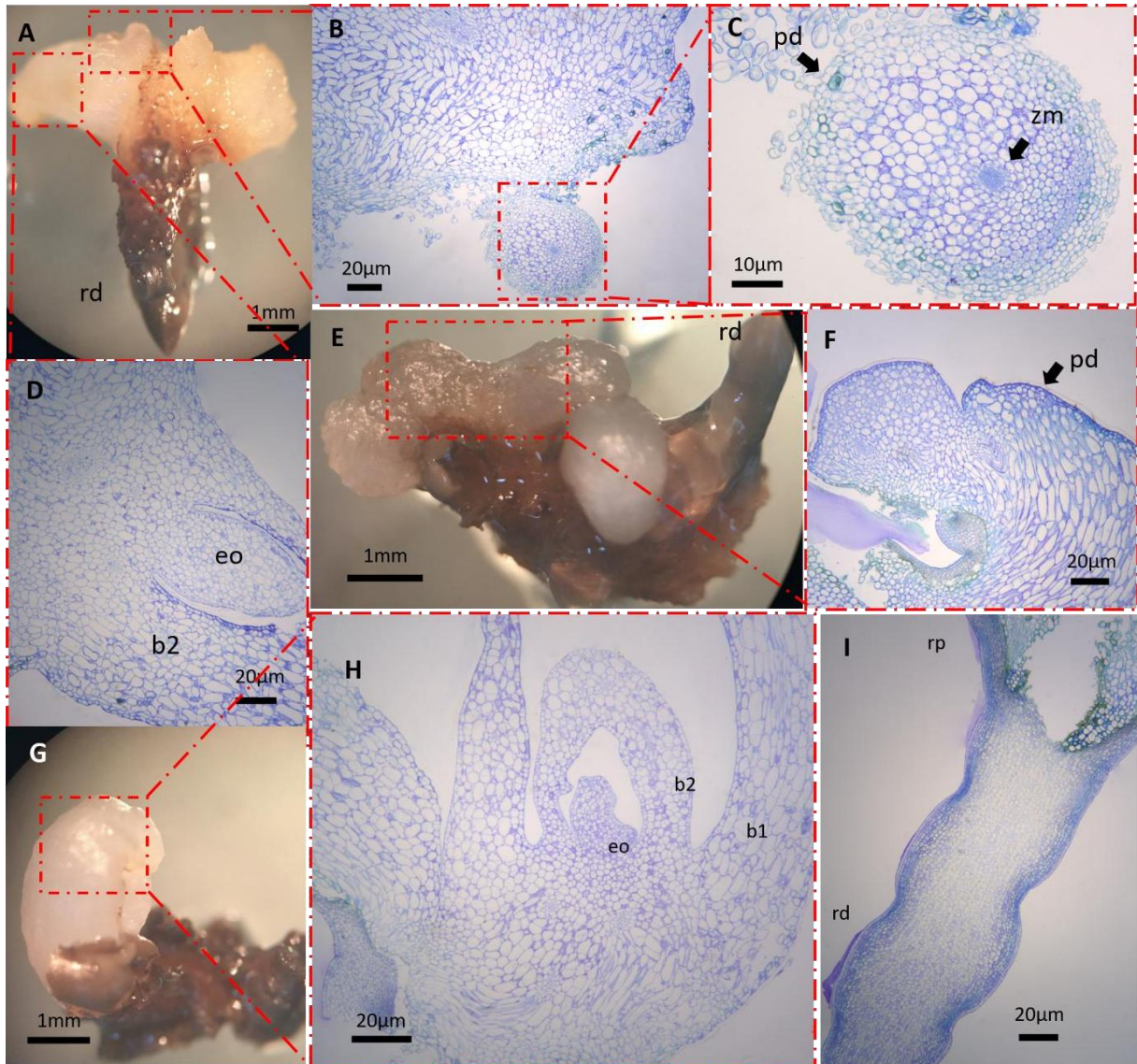


Figura 7- Cortes anômicos dos calos observados após 30 dias após inoculação. Em A, B, C e D estruturas formadas a partir do tratamento (COQ/ESM); em B e C detalhe ampliado da estrutura semelhante a pró-embrião globular, seta preta indicada por (pd) mostra formação de protoderme, seta preta indicada por (zm) mostra zona meristemática. Em E e F calo oriundo do tratamento MS/ESM, seta preta indicada por (pd) mostra formação de protoderme. Em G e H detalhe da germinação do embrião no tratamento MS/ESM. Em I detalhe da região distal com visualização dos danos de esmagamento. rd- região distal, rp- região proximal, eo- eófilo 1, b1- bainha 1, b2- bainha 2, pd- protoderme.

4.1.3.6 Após 50 dias de cultivo *in vitro*

O escurecimento dos tecidos dos explantes e dos calos formados foram mais pronunciados após 50 dias de cultivo. O tratamento MS, sob injúria de secção do embrião, apresentou células com muitos espaços intercelulares e vacuoladas (Figura 8A), sistema vascular em desenvolvimento (Figura 8C) e formação de protoderme. Já no

MS e injúria por esmagamento do embrião, o calo possuía duas estruturas que se formaram, aparentemente, das bainhas foliares do embrião (Figuras 8D, E). Estavam presentes espaços intercelulares e protoderme definida. No tratamento COQ/ESM, os calos apresentavam pequenas regiões com células ainda vivas, escurecimento severo em grande parte da sua estrutura. As partes dos calos que ainda eram possíveis de serem avaliadas continham células alongadas e vacuoladas, também envolvidas por protoderme (Figuras 8 G, H). Foi observado sistema vascular em desenvolvimento, com células de xilema e floema características (Figura 8 I). Em alguns calos, foi possível constatar o colapso das células, possivelmente pela oxidação celular elevada (Figuras 8 J, K).

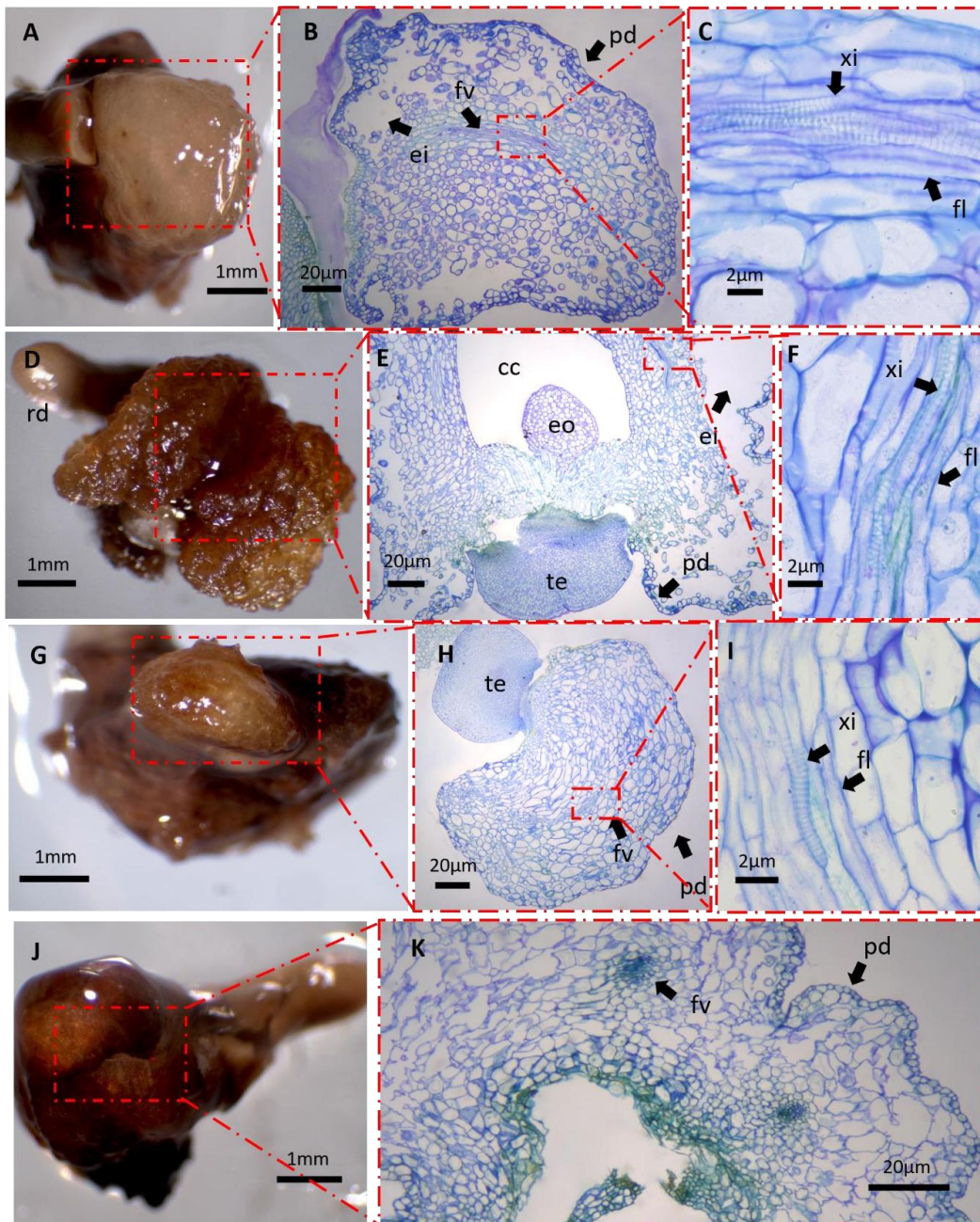


Figura 8- Calos formados em (MS/SEC (A, B, C), MS/ESM (D, E, F), COQ/ESM (G, H, I), COQ/ESM (J, K) aos 50 dias de cultivo. Em B, E e K setas pretas indicadas por (ei) mostram espaços intercelulares, indicadas por (fv) mostram formação de feixes vasculares e indicadas por (pd) mostram formação de protoderme. Em C, F e I setas pretas indicadas por (xi) indicam formação de elementos traqueais, contendo células características do xilema e (fl) floema. fv- feixe vascular, ei- espaço intercelular, pd- protoderme, xi- protoxilema, fl- protofloema, rd- região distal, eo- eófilo, cc- cavidade cotiledonar, te- tecido remanescente do embrião zigótico.

Experimento 2: Efeito de reguladores de crescimento na indução da embriogênese somática

Os calos primários começaram a se formar 15 dias após a inoculação. Em todos os tratamentos, originaram-se, na região proximal do embrião, apresentando aspecto translúcido e formato arredondado (Figura 1). Em corte anatômico, observa-se que a multiplicação de células parte das proximidades da cavidade cotiledonar (Figura 1). A oxidação não foi identificada em nenhum dos tratamentos nos primeiros 15 dias de cultivo.

Os tratamentos proporcionaram padrões de multiplicação celular distintos, sendo que a dose de 50 μM de 2,4-D + 300 μM de Picloram propiciou células mais arredondadas, com núcleo bastante volumoso, nucléolos bem evidentes, alta relação núcleo/citoplasma e pouco vacuoladas (Figuras 1A, B, C), além de massa de células homogênea. Já em 300 μM de 2,4-D + 50 μM de Picloram, diversos pontos meristemáticos foram identificados (Figuras 1 D, E, F) e, diferente do tratamento anterior, núcleos celulares apresentaram-se menos evidentes. No tratamento em que o 2,4-D foi utilizado isoladamente (300 μM), as células eram mais angulosas, com bastante densidade citoplasmática e núcleos menos evidentes (Figuras 1 G, H, I). Também, 300 μM de Picloram ocasionaram a presença de células angulosas, contendo mais centros meristemáticos e, distinto dos demais tratamentos, foi verificada a divisão celular expandindo-se para além da região cotiledonar do embrião (Figuras 1 J, K, L). A utilização isolada do 2,4D ou picloram levou à deformação das células, o que indica rápida proliferação celular.

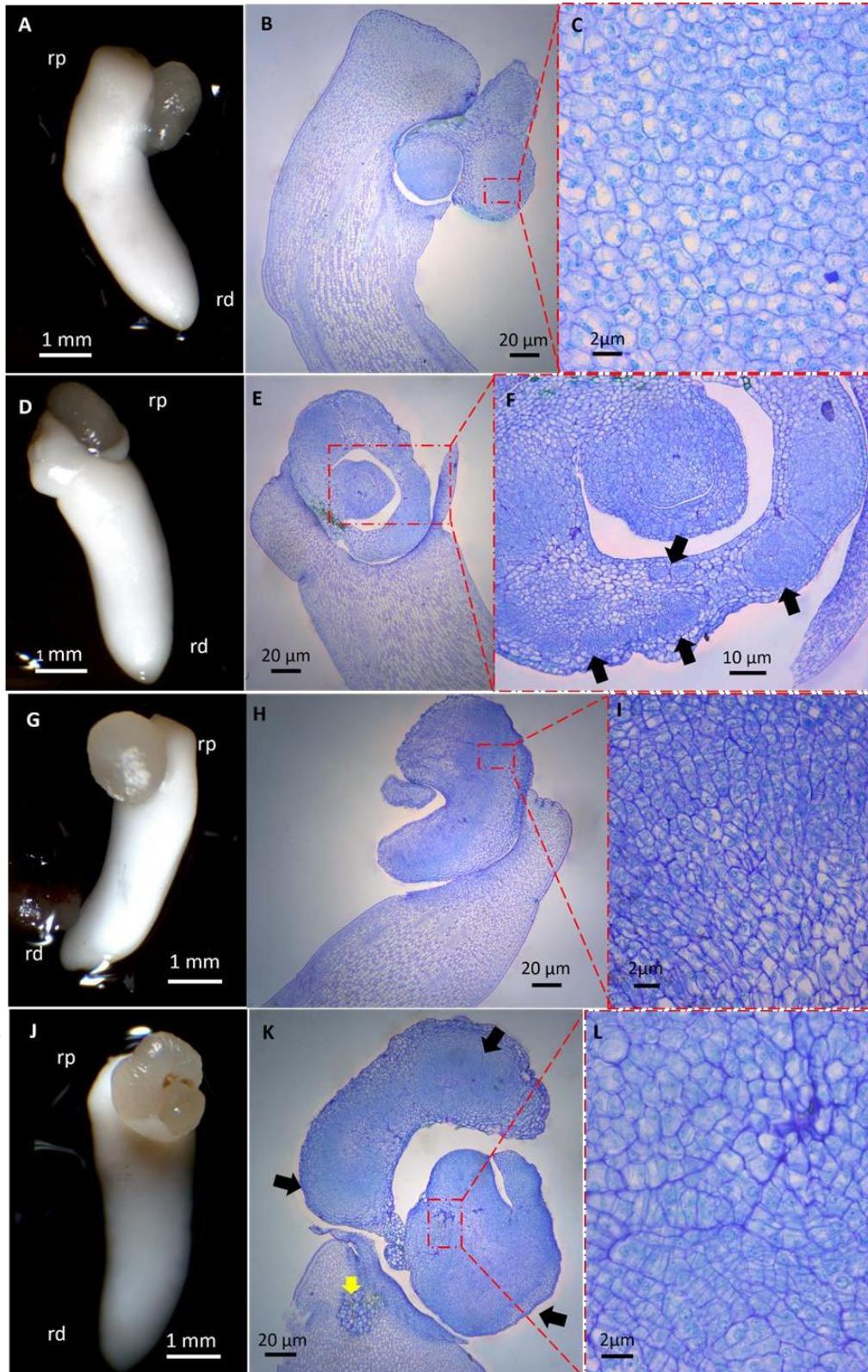


Figura 1- Calos primários formados aos 15 dias após inoculação. A, B, C: 50 μ M de 2,4D+300 μ M de Picloram; D, E, F: 300 μ M de 2,4D+50 μ M de Picloram; G, H, I: 300 μ M de 2,4D, J, K, L: 300 μ M de Picloram. rd- região distal, rp-região proximal. Seta branca indica centro de multiplicação celular próximo à cavidade cotiledonar. Setas pretas em F indicam centros meristemáticos. Setas pretas em K indicam os três pontos de formação dos calos.

Os calos aumentaram de volume, ao longo do cultivo e aos 45 dias, permitindo identificar dois tipos bem definidos: um de aspecto compacto, considerado não embriogênico e outro de aspecto friável, contendo estruturas globulares, denominado embriogênico (Figura 2).

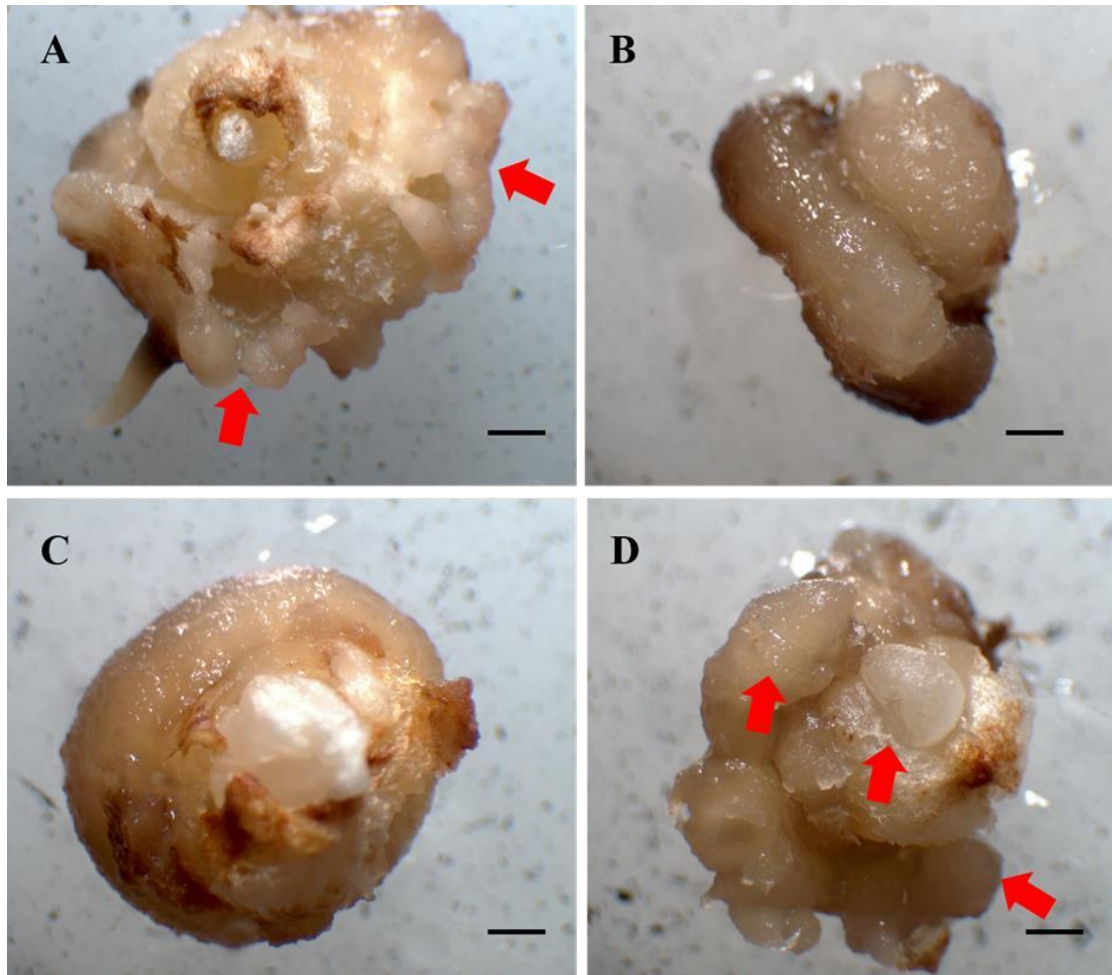


Figura 2- Calos formados em embriões zigóticos de *B. capitata* aos 45 dias após inoculação. A - 50 μ M de 2,4D+300 μ M de Picloram (calo com aspecto embriogênico); B - 300 μ M de 2,4D+50 μ M de Picloram (calo compacto, não embriogênico); C - 300 μ M de 2,4D (calo compacto, não embriogênico, D - 300 μ M de Picloram (calo com aspecto embriogênico). Seta vermelha indica estruturas globulares organizadas (evidência de tecidos embriogênicos). Barras= 1 mm.

Aos 15 dias, não houve diferença significativa entre os tratamentos para a contagem de calos (Figura 3A). Após 45 dias de cultivo, os tratamentos de 50 μ M de 2,4D+300 μ M de Picloram e de Picloram isolado, tanto para o número de calos formados quanto para os calos embriogênicos, foram superiores (Figuras 3B, C), enquanto o 2,4D isolado ou associado em maior proporção ao Picloram desfavoreceu a formação de calos.

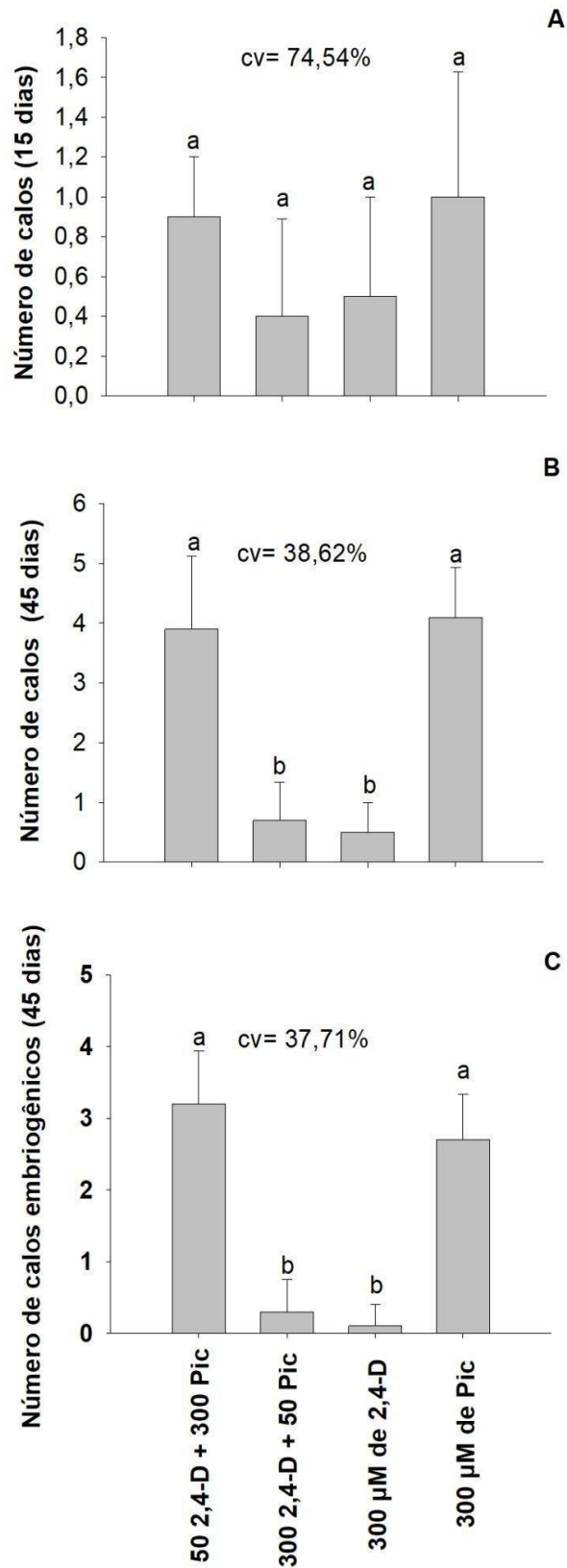


Figura 3- Número de calos aos 15 dias de cultivo (A); Número de calos aos 45 dias de cultivo (A); número de calos com características embriogênicas aos 45 dias de cultivo, caracterizados

por apresentar estruturas globulares organizadas e aspecto friável. Letras distintas indicam diferença significativa pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Pic- Picloram.

O conteúdo endógeno do indolacético (AIA) foi superior nos calos embriogênicos, cinco vezes mais em relação aos explantes e 1,7 ao não embriogênicos (Figura 4A). O conteúdo dos ácidos abscísico e jasmônico também foi superior em calos embriogênicos, cinco vezes em relação aos calos não embriogênicos e embriões zigóticos (explantes) (Figuras 4 B, C).

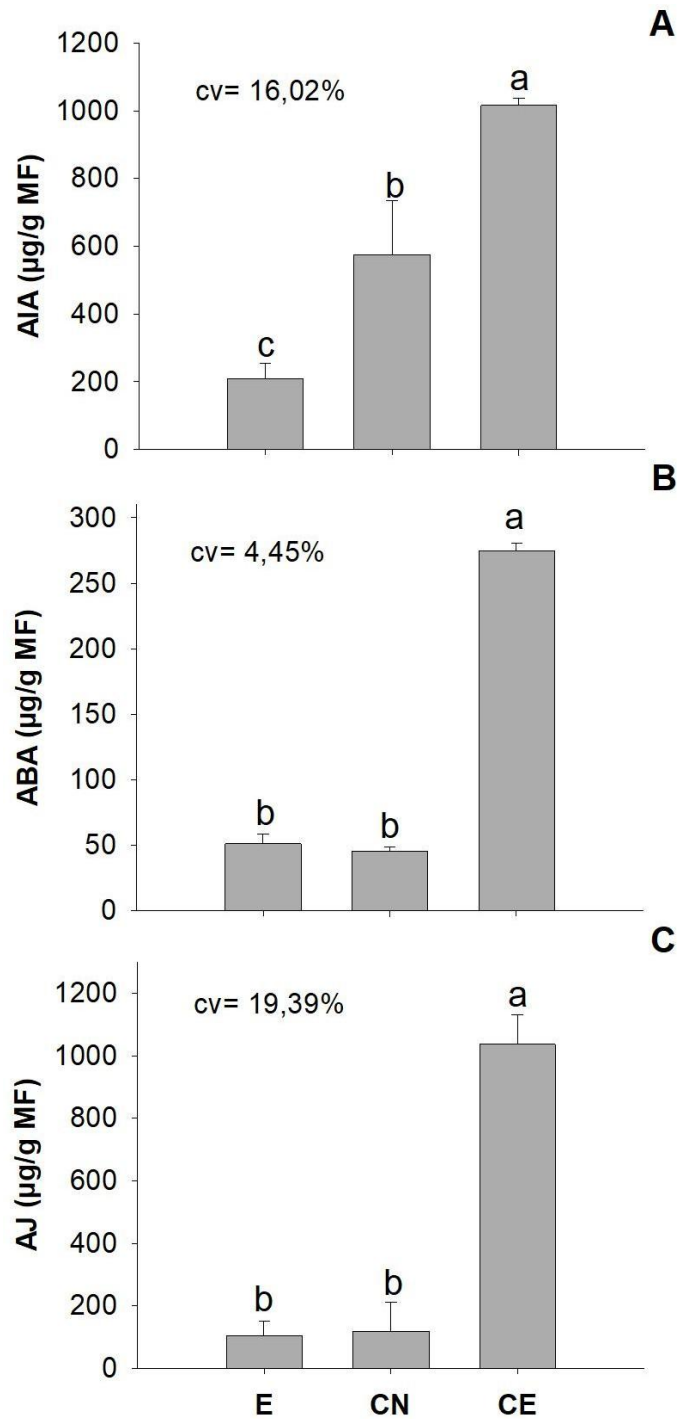


Figura 4- Conteúdo dos ácidos indolacético (A), abscísico (B) e jasmônico (C) em embriões zigóticos (E), calos não embriogênicos (CN) e embriogênicos (CE), no momento da inoculação e após 45 dias de cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de *B. capitata*.

Os calos não embriogênicos eram compactos e translúcidos, contendo células grandes, vacúolos proeminentes e paredes celulares delgadas, além de alguns centros meristemáticos (Figuras 5 A, C). Já os calos embriogênicos apresentaram aspecto friável, contendo estruturas redondas organizadas, além de coloração mais amarelada, células com citoplasma denso, núcleos proeminentes e paredes celulares espessas (Figuras 5 B, D, E). As estruturas redondas possuíam protoderme e indícios de formação de cordão procambial, com sistema vascular fechado, o que indica a ocorrência de pró-embriões somáticos (Figuras 5D, E). Após 100 dias de cultivo, o tratamento de 50 μM de 2,4D+300 μM de Picloram originou um possível embrião somático, com 6 mm de largura, formato oval e coloração branca (Figuras 5 F, G). Anatomicamente, foi possível identificar os cordões procambiais, protoderme e uma cavidade, semelhante à cotiledonar, denotando meristema apical associado (Figura 5 G).

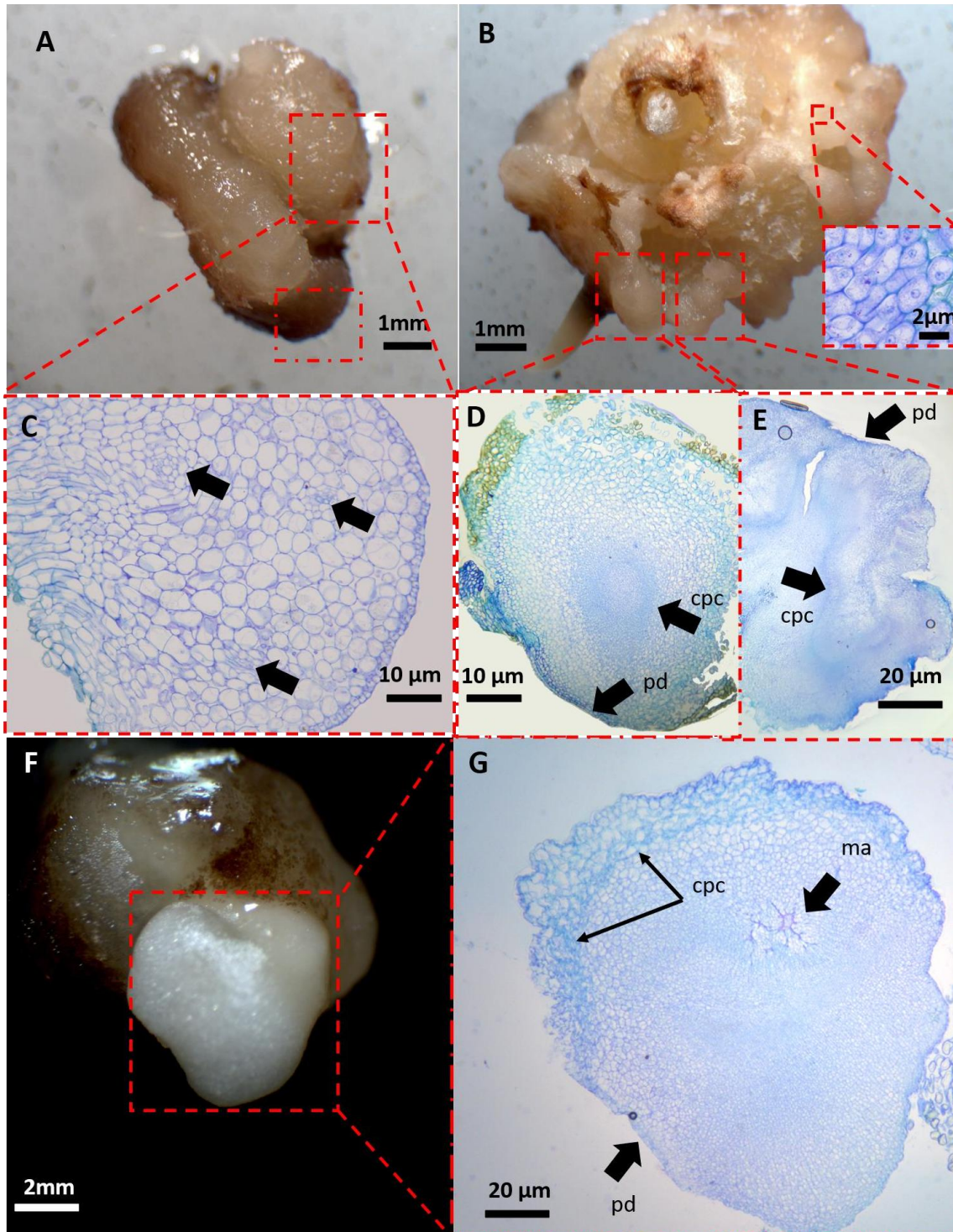


Figura 5- Aspecto anatômico geral de calos não embriogênicos (A, C) e embriogênicos (B, D, E) após 45 dias de cultivo. Aspecto de possível embrião somático formado (F, G) após 100 dias em cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de *B. capitata*. cpc- cordão procambial; ma-meristema apical; pd-protoderme. As setas pretas não identificadas indicam centros meristemoides.

4.1.4 DISCUSSÃO

Experimento 1: Efeito do meio e da injúria na indução da embriogênese somática

O meio COQ promove maior oxidação aparente dos explantes nos primeiros dez dias de cultivo (Tabela 6). Esse comportamento pode estar associado à composição nutricional do meio, que favorece respostas oxidativas iniciais antecedentes à calogênese, que, de fato, após 50 dias, foi também superior no meio COQ. O estresse oxidativo moderado é indicado como um dos fatores iniciais cruciais para a regulação morfogênica, principalmente da embriogênese somática (ZAVATTIERI *et al.*, 2010; WÓJCIK *et al.*, 2020; GARCIA *et al.*, 2022). O meio COQ apresenta maiores proporções de ácido bórico (3 vezes mais) e sulfato de cobre (3,5 vezes mais) em relação ao meio MS. O boro e cobre em excesso podem ter contribuído com maior oxidação inicial, pelo efeito de toxicidade (TREVIZAM 2011), já que as proporções adotadas seguiram referência de uma planta adulta e não de um embrião, porém ao longo do cultivo a oxidação no COQ torna-se semelhante ao meio MS.

Os embriões que sofrem algum tipo de injúria apresentam capacidade menor de germinação e maior de formar calos. Isso foi verificado pelo fato de que os injuriados possuem menor crescimento do pecíolo cotiledonar e emissão de parte aérea (Tabela 6; Figura 2D). O crescimento do pecíolo cotiledonar indica expansão do eixo embrionário, durante a germinação de sementes de palmeiras (MAGALHÃES *et al.*, 2013) e a emissão da raiz primária e parte aérea da plântula (COSTA e MARCHI, 2008). Quando qualquer condição estressante inibe a germinação e provoca mudanças morfofisiológicas, ocorre reprogramação genética, o que regula positivamente proteínas e genes de proteção, como enzimas desintoxicantes e osmoprotetores, além de reprimir genes relacionados ao crescimento (POPOVA *et al.*, 2013). Portanto a formação de calos embriogênicos compreende a supressão da germinação precoce pelo embrião zigótico e o início da proliferação celular desdiferenciada (CALISKAN 2004).

Por outro lado, no presente estudo, alguns embriões, mesmo danificados mecanicamente, mantiveram sua capacidade de germinação, principalmente sob injúria por esmagamento. O esmagamento promovido com a pinça pode causar danos leves em alguns embriões que ainda mantêm sua capacidade germinativa, enquanto a outra injúria, secção do embrião, impede, com maior eficiência, a germinação. Nesse sentido, a influência dos danos mecânicos ao embrião depende do tamanho, da profundidade e

da localização da lesão, sendo mais prejudiciais quando ocorrem nas regiões da radícula e da plúmula (SOUZA *et al.* 2009).

O meio COQ, associado às injúrias, provoca maior formação de calos com estrutura globular aos 50 dias de cultivo. Esse meio favorece mais as rotas morfogênicas que o meio MS, por apresentar maior quantidade de calos com estruturas globulares (Tabela 6; Figura 2 E). Os calos globulares indicam processos morfogênicos, como organogênese ou embriogênese somática (TREVIZAM *et al.*, 2011; ZEIN EL DIN, 2021). O meio COQ, possivelmente, atende melhor às demandas nutricionais que o meio MS, uma vez que o balanço de nutrientes adequado do meio de cultura é essencial para as respostas morfogênicas (GUNTER *et al.*, 2007; MUSSIO; RUSIG, 2009; SALAJ *et al.*, 2014; GULZAR *et al.*, 2020). Em alguns casos, o efeito nutricional é mais preponderante que dos reguladores de crescimento no processo de iniciação do tecido embriogênico de (SALAJ *et al.* 2014). Também o ajuste de meios ou mesmo a formulação de novos meios determinam maior embriogênese somática em comparação aos meios padrões (SAHA *et al.*, 2010; OBERSCHELP *et al.*, 2015; OBERSCHELP *et al.*, 2016). Portanto os resultados do presente trabalho reforçam a importância da formulação de meios de cultura específicos e adaptados às exigências nutricionais de cada espécie. A personalização do meio de cultivo, baseada em dados nutricionais precisos, representa uma estratégia promissora, para otimizar a embriogênese somática e outros processos morfogênicos, ampliando o potencial de aplicações biotecnológicas na propagação, conservação e melhoramento genético de espécies vegetais.

A injúria por esmagamento nos embriões proporciona maior atividade da catalase e da peroxidase, inibindo a germinação e favorecendo a formação de calos (Tabelas 6 e 7). O estresse celular, por meio de injúria do explante ou outros fatores, é determinante na indução da embriogênese somática (GANESAN; JAYABALAN, 2004; LIBIK *et al.*, 2005; KONIECZNY *et al.*, 2008; FEHÉR *et al.*, 2003; MARTIN *et al.*, 2018; WÓJCIK *et al.*, 2020). Além disso, o aumento da atividade de enzimas antioxidantes está associado às respostas morfogênicas, principalmente, indução de calos (GALLEGO *et al.*, 2014; MANIVANNAN *et al.*, 2015; RIAZ *et al.*, 2018; POLESI *et al.*, 2023). A atividade da peroxidase é identificada como sendo superior em calos embriogênicos que em calos não embriogênicos (EL-HADRAMI, 1995), o que pode também explicar maior atividade dessa enzima nos calos oriundos do meio COQ sob injúria.

Outras formas de indução, associadas ou não à aplicação de fitorreguladores, têm sido exploradas, principalmente relacionadas ao estresse *in vitro*, como: radiação

ultravioleta, íons de metais pesados, choques osmóticos, desidratação, choques de alta e baixa temperatura e antibióticos, bem como indução química e mecânica (ZAVATTIERI *et al.* 2010; GARCIA *et al.* 2019). Um certo nível de ROS é necessário para induzir a embriogênese somática, como a resposta ao estresse induzida por ferimento, esterilização química e osmótica (ORŁOWSKA, 2020; HOLOBIUUC. 2015). De forma geral, o embrião necessita de um ambiente inicial redutor para melhor desenvolver-se (PULLMAN *et al.*, 2015). Essa perspectiva reforça a importância de explorar novas formas de indução da embriogênese somática com aplicações para biotecnologia vegetal de potencial impacto na regeneração e conservação de plantas.

Aos 10 dias de cultivo, o predomínio da coloração amarelada, bem como estrutura globosa dos calos originários do meio COQ (Figura 2E) podem ter relação com o tipo e conteúdo celular das células que os formam. A coloração amarelada de estruturas embriogênicas, bem como o aspecto mais arredondado é verificada em estudo de embriogênese somática da palmeira macaúba e tamareira (MEIRA *et al.*, 2019; MAZRI *et al.*, 2018), enquanto a coloração mais leitosa e formato irregular é comumente associada a calos não embriogênicos (ZHANG *et al.*, 2021). Além disso, o meio COQ junto com as injúrias do embrião proporcionam a formação de centros meristemáticos e células pequenas, agregadas e com alta relação núcleo/citoplasma (Figuras 5 I, J, L, M e 7 B, C). Essas características são marcantes de calos embriogênicos (QUIROZ *et al.*, 2006; FEHÉR *et al.*, 2015), uma vez que apresentam células pequenas, esféricas, agregadas, com elevada relação núcleo/citoplasma, poucos e pequenos vacúolos, além de organelas abundantes e parede celular espessa (ALY *et al.*, 2002; FEHER *et al.*, 2003; BALZON *et al.* 2013; SILVA CARDOSO *et al.* 2019; CARDOSO *et al.*, 2020; DE CAMPOS *et al.*, 2020).

Aos 15 dias de cultivo, os calos oriundos do meio COQ não apresentam características de germinação, predominando células com características embriogênicas (células pequenas, com citoplasma denso, pouco vacuoladas e com paredes espessas). Já os calos originários de MS apresentam predominantemente características germinativas e células com padrão não embriogênico. O isolamento total ou parcial de estruturas calosas oriundas do meio COQ associadas ao desenvolvimento de sistemas vasculares sugerem rotas morfogênicas associadas à embriogênese somática. O isolamento de estruturas globosas com sistema vascular independente do explante são características marcantes de embriões somáticos em desenvolvimento (VON ARNOLD *et al.* 2002; HORSTMAN *et al.* 2017; DU *et al.*, 2020).

Aos 30 dias de cultivo, calos originários do meio COQ apresentam características pouco embriogênicas, com células maiores e com citoplasma pouco densos (DU *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2021), inclusive, com o desenvolvimento da parte aérea do embrião inoculado (Figura 5 D). No entanto o mesmo calo também possui estrutura globular com tênue conexão ao explante esmagado e com características descritas de um embrião somático em estágio globular, células pequenas, com alta atividade, estrutura redonda e tendência de isolamento de feixes vasculares, como já descrito na literatura (VON ARNOLD *et al.* 2002; CARDOSO *et al.*, 2020; HORSTMAN *et al.* 2017). Os calos oriundos de MS possuem padrão não embriogênico ou estruturas germinativas. Estruturas arredondadas em isolamento também são identificadas, porém com células de padrão não embriogênico, nem indicativo de sistema vascular se formando (DU *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2021).

Aos 50 e 70 dias de cultivo, aspectos morfoanatômicos indicam colapso dos tecidos, sendo esse o período máximo para uma possível subcultura dos calos (Figura 8 K). O acúmulo de compostos fenólicos e etileno pode ter sido crítico nesse período, prejudicando o crescimento celular. No cultivo *in vitro*, o etileno se acumula ao longo do tempo, além de ser produzido de forma autocatalítica, com potencialização decorrente de injúrias físicas (VIKRANT, 2018; GARCIA *et al.*, 2022).

Experimento 2: Efeito de reguladores de crescimento na indução da embriogênese somática

Todas as combinações de fitorreguladores testadas induzem a formação de calos a partir de embriões zigóticos de *B. capitata*. No entanto o picloram, tanto isoladamente quanto em combinação com menor concentração de 2,4-D, é mais eficiente na indução de calos embriogênicos (Figura 4). O Picloram tem se mostrado superior em relação ao 2,4D para indução de embriogênese somática de várias espécies de palmeiras, como em *Elaeis guineensis* (BALZON *et al.*, 2013), *Syagrus oleracea* (SILVA-CARDOSO *et al.*, 2019a e SILVA-CARDOSO *et al.*, 2022), *Acrocomia aculeata* (MEIRA *et al.*, 2020) e *Euterpe precatoria* (FERREIRA *et al.*, 2022a/2022b). Entretanto, em *B. odorata*, a concentração de 361,99 µM de 2, 4D e 50 µM Picloram proporciona melhor formação de calos primários, porém grande parte dos embriões somáticos são deformados e não germinam (CAMPOS *et al.*, 2020). Os resultados reforçam a evidência de que o uso

Picloram é muito importante na calogênese da espécie, bem como na escolha de sua dosagem.

No início da formação de calos, ocorre proliferação de células com características embriogênicas, isodiamétrica, alta relação núcleo/citoplasma, nucléolos evidentes e citoplasma denso, principalmente com a dose de 50 μM de 2,4D + 300 μM de Picloram. As células apresentam padrão. As células consideradas competentes para embriogênese somática contêm núcleos proeminentes, citoplasma denso e originaram-se da epiderme de embriões zigóticos (DUCROCQ *et al* 1994). Outros autores relatam que, em palmeiras, em geral, as células de calos embriogênicos são pequenas, isodiamétricas e agregadas, com alta relação núcleo/citoplasma, poucos e pequenos vacúolos, organelas abundantes e paredes celulares espessas (BALZON *et al.*, 2013; SILVA- CARDOSO *et al.* 2019b; CAMPOS *et al.*, 2020). A semelhança com os padrões descritos na literatura fortalece a proposição de que a morfologia externa dos calos pode ser uma característica visual útil na identificação precoce de tecidos embriogênicos em *B. capitata*.

Aos 45 dias de cultivo, a evolução dos calos, em nível morfológico, é evidente, com a formação de estruturas globulares de diversos tamanhos, principalmente nos tratamentos com maior dose de Picloram ou no seu uso isolado (Figuras 2 A, D). Calos embriogênicos são, em geral, aglomerados arredondados de diferentes tamanhos (ZEIN EL DIN, 2021), além de friáveis e coloração clara e amarelo-acastanhados (MAZRI *et al.*, 2018; MEIRA *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2021; DU *et al.*, 2020). A semelhança com os padrões descritos na literatura fortalece a proposição de que a morfologia externa dos calos pode ser um parâmetro visual útil na identificação precoce de tecidos embriogênicos em *B. capitata*.

O elevado conteúdo dos ácidos indolacético, abscísico e jasmônico nos calos embriogênicos compreende processo de indução de embriogênese somática. A biossíntese de auxina endógena é desencadeada pela aplicação de auxinas exógenas (WÓJCIK *et al.*, 2020; KUMAR e VAN STADEN 2017; WU *et al.* 2021; VONDRAKOVA 2018), aumentando a competência celular para a embriogênese somática, como pode ter ocorrido com o uso do Picloram no presente trabalho. No cultivo *in vitro* de tamarillo (*Solanum betaceum*), o conteúdo endógeno de IAA é maior em calos embriogênicos que os não embriogênicos, com uma tendência a aumentar, à medida evolui a desdiferenciação do explante original (segmentos foliares), com confirmação de resposta de expressão gênica diferencial para os dois tipos de calos (CAEIRO, 2022). O ácido

jasmônico (AJ) está relacionado com a desdiferenciação de células somáticas, proporcionando maior conteúdo deste nos tecidos embriogênicos (MIRA 2016, ELHITI *et al.*, 2013).

O ácido abscísico (ABA) está envolvido em processos de regulação do crescimento, desenvolvimento e às respostas ao estresse vegetal. A sinalização do ácido abscísico (ABA) é confirmada como vital, atuando como um fitormônio de estresse durante a indução do embrião somático (FEHÉR, 2015). O uso de auxinas sintéticas como o 2,4D induz a produção de etileno, que atua, sobretudo, em conjunto com o ácido jasmônico, o ácido salicílico e o próprio ABA, para regular diversos processos biológicos, incluindo estresse oxidativo, hipóxia e morte celular programada (WANG *et al.*, 2002). Esses fatores interferem diretamente na aquisição de competência embriogênica e no desenvolvimento de tecidos embriogênicos (KIKUCHI *et al.*, 2006; GULZAR *et al.*, 2020), explicando o aumento desse fitorregulador nos calos embriogênicos.

A organização de cordões procambiais em estruturas redondas, após 45 dias, representa forte indicativo de organização embriogênica. Tal fator associa-se à diferenciação de embriões somáticos (VON ARNOLD *et al.*, 2002; CARDOSO *et al.*, 2020; HORSTMAN *et al.*, 2017). A organização de estrutura semelhante a um embrião somático no tratamento 50 μ M de 2,4D + 300 μ M de Picloram, após 100 dias de cultivo, representa um avanço significativo no processo de embriogênese somática em *B. capitata*. A presença de estruturas anatômicas como cordões procambiais, protoderme, cavidade cotiledonar e meristema apical sugere a organização interna compatível com a embriogênese somática. Esses componentes são característicos de embriões somáticos em diferenciação, indicando que, além da indução inicial, o tratamento favorece a progressão do desenvolvimento embrionário. Resultados semelhantes são observados em *Syagrus oleracea*, uma vez que estruturas organizadas com tecidos embrionários definidos estão associadas ao uso do Picloram em alta concentração (SILVA-CARDOSO *et al.*, 2022). Isso contribui para confirmar a eficiência do tratamento com 50 μ M de 2,4-D + 300 μ M de Picloram, na indução de calos com alto potencial embriogênico e na promoção do desenvolvimento de estruturas embrionárias organizadas, apontando para sua viabilidade como protocolo base para a regeneração de plantas via embriogênese somática em *B. capitata*.

4.1.5 CONCLUSÃO

O estresse causado pelas injúrias mecânicas e o meio de cultivo COQ favorecem o estresse oxidativo e as rotas calogênicas, algumas com potencial embriogênico. As estruturas calosas se formam, majoritariamente, na região da cavidade cotiledonar do embrião com características embriogênicas, células isodiamétricas, núcleo evidente e citoplasma denso. O uso de 50 μM de 2,4-D + 300 μM de Picloram e 300 μM de Picloram proporciona maior concentração de auxinas endógenas em calos embriogênicos e possível formação de embrião somático de *B. capitata* após 100 dias de cultivo *in vitro*. O trabalho é pioneiro para a espécie, sendo uma etapa bastante importante para viabilizar a propagação vegetativa dessa relevante palmeira nativa do Cerrado.

4.1.6 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J.A.S.; SILVAROLLA, M.B. Induction of somatic embryos of *Coffea arabica* genotypes by 6-benzyladenine. **International Journal of Plant Developmental Biology**, v.3, p.5-9, 2009. Disponível em: [http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/0906/IJPDB_3\(1\)/IJPDB_3\(1\)5-9o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/0906/IJPDB_3(1)/IJPDB_3(1)5-9o.pdf)

ALY, M.A.M.; RATHINASABAPATHI, B.; KELLEY, K. Somatic embryogenesis in perennial static *Limonium bellidifolium*, Plumbaginaceae. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.68, p.127-135, 2002. DOI <https://doi.org/10.1023/A:1013803031374>

ANDRADE, A *et al.* Explant age and genotype drive the somatic embryogenesis from leaf explants of *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.(Arecaceae), an alternative palm crop for oil production. **Trees**, v. 38, n. 2, p. 315-326, 2024. DOI <https://doi.org/10.1007/s00468-023-02484-4>

BALZON, T. A; LUIS, Z. G; SCHERWINSKI-PEREIRA JE. New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. **In Vitro Cell Dev**, v.49, n.1, p. 41-50, 2013. DOI <https://doi.org/10.1007/s11627-012-9479-3>

BEAUCHAMP, C., e FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**,v. 44, n.1, p. 276–287, 1971. DOI [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)

BLAZQUEZ, S *et al.* Somatic embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.). Histological differentiation and implication of some components of the antioxidant enzymatic system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 97, n. 1, p. 49-57, 2009. DOI [10.1007/s11240-009-9497-y](https://doi.org/10.1007/s11240-009-9497-y)

CALISKAN, M., TURET, M. e CUMING, A. C. Formation of wheat (*Triticum aestivum* L.) embryogenic callus involves peroxide-generating germin-like oxalate oxidase. **Planta**, v. 219, n. 1, p. 132-140, 2004. DOI <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1199-9>

CAMPOS, S. S. DE, SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. BERND, R. B., FIOR, C. S., & SCHWARZ, S. F. Somatic embryogenesis as an alternative for in vitro multiplication of *Butia odorata* from mature zygotic embryos. **Anais Da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92 (supp1), p.1–13, 2020. DOI <https://doi.org/10.1590/0001-3765202020181215>

CARVALHO, J. M. F. C; SILVA M. M. DE A; MEDEIROS, M. J. L. Fatores inerentes à Micropropagação. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 28. (Embrapa Algodão. Documentos, 148). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/276578/1/DOC148.pdf>

CHANCE, B., & MAEHLY, A. C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v.2, p.764–775, 1955. DOI [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(55\)02300-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(55)02300-8)

CHOI YE, YANG DC, PARK JC, SOH WY & CHOI KT. Regenerative ability of somatic single and multiple embryos from cotyledons of Korean ginseng on hormone-free medium. **Plant Cell Rep**, v 17, p. 544–551, 1998. DOI <https://doi.org/10.1007/s002990050439>

CHRISTIANSON, M. L; WARNICK, D. A. Competence and Determination in the Process of *in vitro* Shoot organogenesis. **Developmental Biology**, v. 95, ed.2, p. 288-293, 1983. DOI [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(83\)90029-5](https://doi.org/10.1016/0012-1606(83)90029-5)

D. GAJ, M. Direct somatic embryogenesis as a rapid and efficient system for *in vitro* regeneration of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 64, p. 39–46, 2001. DOI <https://doi.org/10.1023/A:1010679614721>

DU, Y., CHENG, F., & ZHONG, Y. Induction of direct somatic embryogenesis and shoot organogenesis and histological study in tree peony (*Paeonia* sect. *Moutan*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.141, n.3, p. 557–570, 2020. DOI <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01815-4>

DUCROCQ, C., SANGWAN, RS, e SANGWAN-NORREEL, BS. Production of Agrobacterium-mediated transgenic fertile plants by direct somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Datura innoxia*. **Plant Molecular Biology**, v. 25, n.6, p. 995–1009, 1994. DOI <https://doi.org/10.1007/BF00014673>

EEUWENS, C. J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**. v. 36, p. 23-28, 1978. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1976.tb05022.x>

ELHITI, M.; STASOLLA, C.; WANG, A. Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. V. 49, p. 631-642, 2013. DOI <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9547-3>

EMBRAPA-Empresa Brasileiro de Pesquisa Agropecuária. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes / editor técnico, Fábio Cesar da Silva. – 2. ed. rev. ampl. - Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/330496>

FARIA, J.P., ALMEIDA, F., SILVA, L.C.R., VIEIRA, R.F., AGOSTINI-COSTA, T.S. Chemical characterization of pulp of *Butia capitata* var *capitata*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n. 3, p. 827–829, 2008. DOI <https://doi.org/10.1590/S0100-29452008000300045>

FEDER, N; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods.

American Journal of Botany, v.55, p. 123–142, 1968. DOI <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1968.tb06952.x>

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. DOI <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.07.005>

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.74, p.201-228, 2003. DOI <https://doi.org/10.1023/A:1024033216561>

FERREIRA, L. G. R. Fisiologia Vegetal: Relações Hídricas. 1st ed. Fortaleza: Edições UFC, 1992, 138p.

FERREIRA, J. C. B. DE ARAÚJO SILVA-CARDOSO, I. M.; DE OLIVEIRA MEIRA, R.; SCHERWINSKI PEREIRA, J.E. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of the palm tree *Euterpe precatoria* Mart. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 148, p. 667–686, 2022a. DOI <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02227-2>

FERREIRA, J. C. B. DE ARAÚJO SILVA-CARDOSO, I. M., MEIRA, R. O. DA SILVA COSTA, F. H., & SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Towards development of an efficient somatic embryogenesis protocol for the palm tree *Euterpe precatoria* (Mart.) from leaf tissues of adult plants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 58, n.5, p.750–768, 2022b. DOI <https://doi.org/10.1007/s11627-022-10310-8>

FISHER, A. C., KAMGA, M. H., AGARABI, C., BRORSON, K., LEE, S. L., YOON, S. The Current Scientific and Regulatory Landscape in Advancing Integrated Continuous Biopharmaceutical Manufacturing. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 253–267, 2019. DOI <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.08.008>

GALLEGO, P; MARTIN, L; BLAZQUEZ, A; GUERRA, H; VILLALOBOS, N. Involvement of peroxidase activity in developing somatic embryos of *Medicago arborea* L. Identification of an isozyme peroxidase as biochemical marker of somatic embryogenesis. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, n.2, p. 78–84, 2014. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.09.017>

GANESAN, M.; JAYABALAN, N. Evaluation of haemoglobin (erythrocyte): for improved somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR 2). **Cell Biology and Morphogenesis**, v. 23, p. 181-187, 2004. DOI <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0822-y>

GARCIA, C; ALMEIDA, F.A.A; BRITTO, D; CORREA., P.M; SILVA,L; SILVA, J; ROYAERT, S; MARELLI, P,J. Single-base resolution methylomes of somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* L. reveal epigenome modifications associated with somatic embryo abnormalities. **Scientific Reports**, v.12, n1, p.1-19, 2022. DOI <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18035-9>

GREER, M. S; KOVALCHUK, I; EUDES, F. Ammonium nitrate improves direct somatic embryogenesis and biolistic transformation of *Triticum aestivum*. **New Biotechnology**, v. 26, ed. (1–2), p. 44–52, 2009. DOI <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2009.02.003>

GROLL J, MYCOCK DJ, GRAY VM. Effect of medium salt concentration on differentiation and maturation of somatic embryos of cassava (*Manihot esculenta Crantz*). **Annals of Botany**, v. 89, ed.5, p. 645–648, 2002. Ann Bot 89:645–648. DOI <https://doi.org/10.1093/aob/mcf095>

HAZUBSKA-PRZYBYŁ, T.; RATAJCZAK, E.; OBARSKA, A.; PERS-KAMCZYC, E. Different roles of auxins in somatic embryogenesis efficiency in two picea species. **Int. J. Mol. Sci**, v.21, p.3394, 2020. DOI 10.3390/ijms21093394

HORSTMAN, A., BEMER, M., BOUTILIER, K. A transcriptional view on somatic embryogenesis. **Regeneration**. v.4, p. 201–216, 2017. DOI <https://doi.org/10.1002/reg2.91>

ISAH, T. Induction of somatic embryogenesis in woody plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, n.38, p.118, 2016. DOI <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2134-6>

JIMÉNEZ, VM. Regulação da embriogênese somática in vitro com ênfase no papel dos hormônios endógenos. **Rev. Bras. Fisiol. Veg**, v. 13 , p. 196–223, 2001. DOI 10.1590/S0103-31312001000200008

KIM, Y. W, MOON, H. K. Enhancement of somatic embryogenesis and plant regeneration in Japanese larch (*Larix leptolepsis*). **Plant Cell Tiss Organ** v. 88, p. 241–245, 2007. DOI <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9202-y>

KINTZIOS, S., DROSSOPOULOS, J.B. & LYMPEROPOULOS, C. Effect of vitamins and inorganic micronutrients on callus growth and somatic embryogenesis from leaves of chilli pepper. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 67, p. 55–62, 2001. DOI <https://doi.org/10.1023/A:1011610413177>

KIKUCHI, A., SANUKI, N., HIGASHI, K., KOSHIBA, T., e KAMADA, H. (2006). Abscisic acid and stress treatment are essential for the acquisition of embryogenic competence by carrot somatic cells. **Planta**, v. 223, n. 4, p.637–645. DOI <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0114-y>

KONIECZNY, R.; LIBIK, M.; TULEJA, M.; NIEWIADOMSKA, M. Oxidative events during in vitro regeneration of sunflower. **Acta Physiol Plant**, v. 30, p. 71–79, 2008. DOI <https://doi.org/10.1007/s11738-007-0092-8>

KOTHARI SL, AGARWAL K, KUMAR S. Inorganic nutrient manipulation for highly improved in vitro plant regeneration in finger millet—*Eleusine coracana* (L.) Gaertn. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 40, p. 515–519, 2004. DOI <https://doi.org/10.1079/IVP2004564>

KUMAR, V., VAN STADEN, J. New insights into plant somatic embryogenesis: an

epigenetic view. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.39, p.194, 2017. DOI <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2487-5>

LIBIK, M.; KONIECZNY, R.; PATER, B.; SLESIAK, I.; MISZALSKI, Z. Differences in the activities of some antioxidant enzymes and in H₂O₂ content during rhizogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of the ice plant. **Plant cell rep.**, v. 23, p. 834-841, 2005. DOI <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0886-8>

LIU, H; ZHANG, H; DONG, Y. X; HAO, Y. J; ZHANG, X. S. DNA METHYLTRANSFERASE1-mediated shoot regeneration is regulated by cytokinin-induced cell cycle in Arabidopsis. **New Phytologist**, v. 217, p. 219–232, 2018. DOI <https://doi.org/10.1111/nph.14814>

LOPES, C. A. et al. Indução de calos, potencial embriogênico e estabilidade genética em pitaiá vermelha. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 11, n. 1, p. 21-25, 2016. DOI [10.5039/agraria.v11i1a5355](https://doi.org/10.5039/agraria.v11i1a5355)

MAGALHÃES, H. M.; LOPES, P. S. N.; RIBEIRO, L. M.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; OLIVEIRA, D. M. T. Structure of the zygotic embryos and seedlings of *Butia capitata* (Arecaceae). **Trees**, v. 27, n. 1, p. 273-283, 2013. DOI [10.1007/s00468-012-0797-1](https://doi.org/10.1007/s00468-012-0797-1)

MAGNANI, E.; JIMÉNEZ-GÓMEZ, J.; SOUBIGOU-TACONNA, L.; LEPINIEC, L.; FIUME, E. Perfil do início da embriogênese somática em Arabidopsis. **BMC Genomics**, v.18, p. 998, 2017. DOI <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4391-1>

MANIVANNAN, A., JANA, S., SOUNDARARAJAN, P., KO, C. H., & JEONG, B. R. Antioxidant enzymes metabolism and cellular differentiation during the developmental stages of somatic embryogenesis in "*Torilis japonica*" (Houtt.) DC. **Plant Omics**, v.8, n5, p.461–471, 2015. DOI <https://search.informit.org/doi/10.3316/informit.516864120146941>

MARISOL OCHOA-VILLARREAL, HOWAT, S., HONG, S. M. JANG, M. O., JIN, Y. W., LEE, E. K., LOAKE, G. J. Plant cell culture strategies for the production of natural products. **BMB Reports**, v.49, n.3, p. 149–158, 2016. DOI <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2016.49.3.264>

MARTIN, F. *et al.* Overexpression of EcGSH1 induces glutathione production and alters somatic embryogenesis and plant development in *Hevea brasiliensis*. **Ind Crops Prod**, v. 112, p. 803–814, 2018. DOI <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.12.057>

MARTINEZ, P.E.H; CLEMENTE, M.J. O uso do Cultivo Hidropônico de Plantas em Pesquisa. Viçosa, MG: Editora UFV, 76 p, 2011.

MAZRI, M. A., BELKOURA, I., MEZIANI, R., MOKHLESS, B., NOUR, S. Somatic embryogenesis from bud and leaf explants of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Najda. **3 Biotech**, v.7, n. 58, p.1-9, 2017. DOI <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0676-y>

MAZRI, M. A; MEZIANI, R; BELKOURA I; MOKHLESS, B; NOUR, S. A combined pathway of organogenesis and somatic embryogenesis for an efficient large-scale propagation in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Mejhoul. **3 Biotech**, v.8, n.4, p. 215, 2018. DOI <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1235-x>

MEIRA, F.S, *et al.* "Developmental pathway of somatic embryogenesis from leaf tissues of macaw palm (*Acrocomia aculeata*) revealed by histological events." **Flora**, v.250 p. 59-67, 2019. DOI <https://doi.org/10.1016/j.flora.2018.11.011>

MEIRA, F; LUIZ, Z. G; SILVA-CARDOSO, I.M.A; SCHEWINSKI-PEREIRA, J. E. Somatic embryogenesis from leaf tissues of macaw palm [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart]. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 92, n.3, e20180709, 2020. DOI <https://doi.org/10.1590/0001-3765202020180709>

MÉNDEZ-HERNÁNDEZ, H. A *et al.* Signaling Overview of Plant Somatic Embryogenesis. **Frontiers in Plant Science**, v.10, p.77, 2019. DOI <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00077>

MIRONOVA, W. TEALE, M. SHAHRIARI, J. DAWSON, K. PALME. The Systems Biology of Auxin in Developing Embryos. **Trends Plant Sci**, v. 22, n.3, p. 225-235, 2017. DOI <https://10.1016/j.tplants.2016.11.010>

MIRA, M. M. *et al.* Jasmonic acid is a downstream component in the modulation of somatic embryogenesis by Arabidopsis Class 2 phytochrome. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 8, p. 2231-2246, 2016. DOI <https://doi.org/10.1093/jxb/erw022>

MONTORO, P; ETIENNE, H; CARRON, M. P. Effect of calcium on callus friability and somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* Mull. Arg. relations with callus mineral nutrition, nitrogen metabolism and water parameters. **Journal of Experimental Botany**, v. 46, n.2, p. 255–261, 1995. DOI <https://doi.org/10.1093/jxb/46.2.255>

MOURA, E.F; MOTOIKE, S.Y; VENTRELLA, M. C; DE SÁ JÚNIOR, A.Q; CARVALHO, M. Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. **Scientia Horticulturae**, v.119, ed.4, p. 447-454, 2009. DOI <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.08.033>

MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n.3, p.473–497, 1962. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

NAMASIVAYAM, P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v.90, p.1–8, 2007. DOI <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9249-9>

NEVA AC. Plant microtechnique: a note on rapid tissue dehydration. **J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc**, v. 47, n.6, p.459, 1958. DOI <https://doi.org/10.1002/jps.3030470623>. PMID: 13549298.

OBERSCHELP GPJ, GONÇALVES AN, CALDERAN MENEGHETTI E, MENDES GRANER E, ALMEIDA M (2015) Eucalyptus dunnii Maiden plant regeneration via shoot organogenesis on a new basal medium based on the mineral composition of young stump shoots. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 51, p.626-636, 2015. DOI <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9715-8>

OBERSCHELP, G.P.J., GONÇALVES, A.N. Assessing the effects of basal media on the *in vitro* propagation and nutritional status of *Eucalyptus dunnii* Maiden. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.52, p. 28–37, 2016. DOI <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9740-7>

PAIS, M. S. Somatic Embryogenesis Induction in Woody Species: The Future After OMICs Data Assessment. **Frontiers in Plant Science**, v.10, p.240, 2019. DOI <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00240>

PAIVA, É.ÀS, PINHO, SZD, OLIVEIRA, DMT. Large Plant Samples: How to Process for GMA Embedding?. In: Chiarini-Garcia, H., Melo, R. (eds) Light Microscopy. Methods in Molecular Biology. **Humana Press, Totowa, NJ**, v.689, p.37-49, 2011. DOI https://doi.org/10.1007/978-1-60761-950-5_3

PASTERNAK, T. P.; AYAYDIN, E. P. F.; MISKOLCZI, P.; POTTERS, G.; ASARD, H.; ONCKELEN, H. A. V.; DUDITS, D.; FEHÉR; A. The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. **Plant Physiology**, v. 129, p. 1807-1819, 2002. DOI <https://doi.org/10.1104/pp.000810>

PEIXOTO P.H.P *et al.* Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, n.3, p.137-143, 1999. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Aluminum-effects-on-lipid-peroxidation-and-on-theP.H.P.-Cambraia/d64d82f7bfe69796a15024820e4f35e173285a3e>

PRUDENTE, D.O., DE SOUZA, L. & PAIVA, R. Plant Somatic Embryogenesis: Modulatory Role of Oxidative Stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences Natl**, v. 90, p. 483–487, 2020. <https://doi.org/10.1007/s40011-019-01136-3>

POLESI, L.G *et al.* Comparative proteomic analysis and antioxidant enzyme activity provide new insights into the embryogenic competence of *Guadua chacoensis* (Bambusoideae, Poaceae). **Journal of Proteomics**, v. 273, p. 104790, 2023. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2022.104790>

PULLMAN, G. S; ZENG, X; COPELAND-KAMP, B; CROCKETT, J; LUCREZI, J; MAY, S. W; BUCALO, K. Conifer somatic embryogenesis: Improvements by supplementation of medium with oxidation-reduction agents. **Tree Physiology**, v.35, n.2, p. 209–224, 2015. DOI <https://doi.org/10.1093/treephys/tpu117>

QUIROZ FIGUEROA; F. R.; ROJAS HERRERA, R.; GALAZ AVALOS, R. M.; LOYOLA

VARGAS, V.M. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 86, p. 285-301, 2006. DOI <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9139-6>

SAHA, P; BANDYOPADHYAY, S; RAYCHAUDHURI, S. Formulation of Nutrient Medium for In Vitro Somatic Embryo Induction in *Plantago ovata* Forsk. **Biological Trace Element Research**, v. 140, p. 225–243, 2011. DOI <https://doi.org/10.1007/s12011-010-8684-3>

SAHRAWAT AK, CHAND S. Stimulatory effect of copper on plant regeneration in indica rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Plant PhysiologyJ**, v.154, n.4, p.517–522, 1999. DOI [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(99\)80292-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(99)80292-2)

SALAJ, L; FRÁTEROVÁ, M; CÁRACH, J; SALAJ, SLOVAK. The effect of culture medium formulation on *Pinus nigra* somatic embryogenesis. **Dendrobiology**, v.71, p.119-128, 2014. DOI <http://dx.doi.org/10.12657/denbio.071.012>

SAMSON, N. P; CAMPA, C; LE GAL, L; NOIROT, M; THOMAS, G; LOKESWARI, T. S; KOCHKO A. Effect of primary culture medium composition on high frequency somatic embryogenesis in different *Coffea* species. **Plant Cell, Tissue and Organ**, v. 86, p. 37–45, 2006. DOI <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9094-2>

SIBBR (Sistema de informação sobre a biodiversidade brasileira). Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil e Lista da Flora do Brasil, 2020. Disponível em: <https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/284398>. Acesso em fevereiro de 2025.

SILVA, T. S.; CARVALHO FILHO, R. S. L.; TANAN, T. T.; ROCHA, T. C.; SANTANA, J. R. F.. Calogênese em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. **Ciência Florestal.**, Santa Maria, v. 30, n. 3, p. 700-717, 2020. DOI <https://doi.org/10.5902/1980509831689>

SILVA-CARDOSO, I.M.A; MEIRA, F. S; GOMES, A.C.M.M; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Anatomy and histochemistry of somatic embryogenesis of *Syagrus oleracea* from immature inflorescences. **Crop Breed Appl Biotechnol**, v.19, n.4, p.444–450, 2019a. DOI <https://doi.org/10.1590/1984-70332019v19n4n62>

SILVA-CARDOSO, I. M; MEIRA, F. S; GOMES, A. C. M. M; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Histology, histochemistry and ultrastructure of pre-embryogenic cells determined for direct somatic embryogenesis in the palm tree *Syagrus oleracea*. **Physiologia Plantarum**, v. 168, n.4, p. 845–875, 2019b. DOI <https://doi.org/10.1111/ppl.13026>

SILVA-CARDOSO, I.M.A; MEIRA, F. S; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. (2022). The maturity level of explant plays a key role in somatic embryogenesis of the palm tree *Syagrus oleracea* [Mart.]. **Acta Physiologiae Plantarum**, v44, n.87, p1-17. DOI <https://doi.org/10.1007/s11738-022-03420-8>

SILVA, P.A.D; SCARIOT, A. Phenology, biometric parameters and productivity of fruits of the palm *Butia capitata* (Mart.) Beccari in the Brazilian cerrado in the north of the state of Minas Gerais. **Acta Botanica Brasilica**, v. 27, p. 580-589, 2013. DOI <https://doi.org/10.1590/S0102-33062013000300015>

SIVANESAN, I; NAYEEM, S; VENKIDASAMY, B; KUPPURAJ, S. P; RN, C; SAMYNATHAN, R. Genetic and epigenetic modes of the regulation of somatic embryogenesis: a review. **Biologia Futura**, v.73, n.3, p. 259–277, 2022. DOI <https://doi.org/10.1007/s42977-022-00126-3>

SIVILAY, P., CHOI, Y. E. Somatic embryogenesis from the thin cell layer cultures of zygotic and somatic embryos of *Aesculus hippocastanum*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 60, p. 67–74, 2024. DOI <https://doi.org/10.1007/s11627-023-10396-8>

SU, W. W; HWANG, W. I; KIM, S. Y; SAGAWA, Y. Induction of somatic embryogenesis in *Azadirachta indica*. **Plant Cell Tiss Org** v. 50, p. 91–95, 1997. DOI <https://doi.org/10.1023/A:1005891113815>

SUN, J; WANG, M. J; DING, M. Q; DENG, S. R; LIU, M. Q, LU, C. F; ZHOU, X. Y; SHEN, X; ZHENG, X. J; ZHANG, Z. K; SONG, J. H₂O₂ and cytosolic Ca²⁺ signals triggered by the PM H⁺-coupled transport system mediate K⁺/Na⁺ homeostasis in NaCl-stressed *Populus euphratica* cells. **Plant, Cell and Environmen**, v. 33, p. 943–958, 2010. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02118.x>

TREVIZAM, R *et al.* Morfologia de calos de *Eucalyptus urophylla* cultivados in vitro sob concentrações de boro e cálcio. **Floresta**, v. 41, n. 3, p. 563-574, 2011.

VON ARNOLD, S., SABALA, I., BOZHKOVA, P. *et al.* Vias de desenvolvimento da embriogênese somática. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, n.3, p. 233–249, 2002. DOI <https://doi.org/10.1023/A:1015673200621>

VONDRAKOVA, Z *et al.* Profiles of endogenous phytohormones over the course of Norway spruce somatic embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*, v. 9, p. 1283, 2018. DOI [10.3389/fpls.2018.01283](https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01283)

WHITE, PHILIP R. A Handbook of Plant Tissue Culture. **Soil Science**, v.56, n.2, p 151,1943. Disponível em: https://journals.lww.com/soilsci/citation/1943/08000/a_handbook_of_plant_tissue_culture.10.aspx

WILLIAMS EG, MAHESWARAN G. Somatic Embryogenesis: Factors Influencing Coordinated Behaviour of Cells as an Embryogenic Group. **Annals of Botany**, v. 57 n.4, p. 443–462, 1986. DOI <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087127>

WÓJCIK, A.M; WÓJCIKOWSKA, B; GAJ, M. D. Current perspectives on the auxin mediated genetic network that controls the induction of somatic embryogenesis in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v.21, n.4, p.1333, 2020. DOI <https://doi.org/10.3390/ijms21041333>

WU, X. M; KOU, S. J; LIU, Y. L; FANG, Y. N; XU, Q; GUO, W. W. Genomewide analysis of small RNAs in nonembryogenic and embryogenic tissues of citrus: microRNA-and

siRNA-mediated transcript cleavage involved in somatic embryogenesis. **Plant Biotechnology Journal**. V.13, p. 383-394, 2015. DOI <https://doi.org/10.1111/pbi.12317>

ZEIN EL DIN, A. F. M *et al.* Morpho-Anatomical and Biochemical Characterization of Embryogenic and Degenerative Embryogenic Calli of Phoenix dactylifera L. **Horticulturae**, v. 7, n. 10, p. 393, 2021. DOI <https://doi.org/10.3390/horticulturae7100393>

ZHANG, M; WANG, A; QIN, M; QIN, X; YANG, S; SU, S; SUN, Y; ZHANG, L. Direct and Indirect Somatic Embryogenesis Induction in Camellia oleifera Abel. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p.1–14, 2021. DOI <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.644389>

4.2 CAPÍTULO II: 2,4 D NA INDUÇÃO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA UTILIZANDO PLÂNTULAS DE COQUINHO AZEDO (*Butia capitata*)

RESUMO

O coquinho-azedo (*Butia capitata*) é uma palmeira nativa do Cerrado, de grande relevância econômica e social, cujos frutos são amplamente utilizados na culinária regional. A embriogênese somática pode ser uma alternativa de propagação vegetativa para a espécie, facilitando a sua domesticação e implantação de pomares com genótipos superiores. Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi verificar as respostas embriogênicas de folhas jovens às doses do ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), cultivadas em meio desenvolvido com base nas proporções de nutrientes da espécie, denominado COQ. Segmentos foliares imaturos de plântulas foram utilizados, como explantes, sendo inoculados em meio COQ com as seguintes doses de 2,4 D: 0, 100, 200, 300 e 400 μM . Após 15, 30, 50 e 75 dias de cultivo, foram avaliados o número de explantes oxidados, encarquilhados e com presença de calos, bem como a atividade das enzimas do sistema antioxidante (SOD, POX e CAT). Além disso, nessas épocas e antes do cultivo, foram realizados cortes anatômicos. A formação de calos ocorreu em função de todas as doses de 2,4D. Calos embriogênicos foram identificados aos 50 dias de cultivo com μM 300 2,4D e, aos 75 dias, estruturas que apontam para a formação de pró-embriões. A formação de calos em explantes cultivados com 2,4-D correlacionou-se a um aumento gradativo na atividade antioxidante, representada pela CAT e POX, indicando ativação do sistema antioxidante quanto ao possível estresse induzido pelo 2,4D. Os resultados são promissores para nortear estudos de embriogênese somática em coquinho azedo.

Palavras-chave: ácido diclorofenoxiacético; auxina; calogênese; cultura de tecidos; propagação vegetativa.

ABSTRACT

The coquinho azedo (*Butia capitata*) is a palm tree native to the Cerrado, of great economic and social relevance, whose fruits are widely used in regional cuisine. Somatic embryogenesis may be an alternative of vegetative propagation for the species, facilitating its domestication and the implantation of orchards with superior genotypes. In this sense, the objective of the work was to verify the embryogenic responses of immature leaf segments to different doses of dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), cultured in a medium developed based on the nutrient proportions of the species, called COQ. Immature leaf segments from seedlings were used as explants, being inoculated in COQ media with the following doses of 2,4-D: 0, 100, 200, 300, and 400 μM . After 15, 30, 50, and 75 days, the number of oxidized explants, explant curling, and the number of explants with callus formation were evaluated, as well as the activity of enzymes to the antioxidant system (SOD, POX, and CAT). Furthermore, anatomical sections were performed. Callus formation occurred in response to all doses of 2,4-D. Embryogenic calluses were identified at 50 days of cultivation with 300 μM 2,4D, and at 75 days, structures that point out to the formation of pro-embryo. Callus formation in explants cultivated with 2,4-D correlated with a gradual increase in antioxidant activity, represented by CAT and POX, indicating activation of the antioxidant system in response to possible stress induced by 2,4-D. The results are promising for guiding studies of somatic embryogenesis in coquinho azedo.

Keywords: dichlorophenoxyacetic acid; auxin; callogenesis; tissue culture; vegetative propagation.

4.2.1 INTRODUÇÃO

A embriogênese somática proporciona a formação de embriões na ausência de fertilização, constituindo um processo bipolar HORSTMAN *et al.*, 2017; SILVA-CARDOSO *et al.*, 2022. Dessa forma, os embriões somáticos, mediante estímulos apropriados, podem germinar e originar um indivíduo clone daquele que forneceu o explante (HORSTMAN *et al.*, 2017; SILVA-CARDOSO *et al.*, 2022). A embriogênese somática pode ocorrer pela via direta (sem a formação de calos) ou indireta (com a formação de calos). A embriogênese somática direta é caracterizada pela formação de embriões somáticos na própria superfície do explante (HORSTMAN *et al.*, 2017; KUMAR e VAN STADEN, 2017), sendo mais comumente observada no cultivo *in vitro* de embriões zigóticos (DUCROCQ *et al.* 1994; CHOI *et al.*, 1998; D.GAJ *et al.*, 2001). Na indireta, formam-se tecidos amorfos com intensa atividade meristemática (calos), que podem ou não adquirir competência embriogênica (SIVANESAN *et al.*, 2022). O processo de formação do embrião depende de uma complexa regulação das diferentes etapas do desenvolvimento embriogênico, exigindo uma reprogramação genética robusta (HORSTMAN *et al.*, 2017; KUMAR e VAN STADEN, 2017).

A propagação clonal é uma das aplicações mais relevantes da embriogênese somática, especialmente para espécies perenes com ciclos longos e remotas possibilidades de propagação vegetativa, como é o caso das palmeiras (MOURA *et al.*, 2009; MAZRI *et al.*, 2017; DU *et al.*, 2020; SILVA-CARDOSO *et al.*, 2020). Além disso, essa técnica tem grande potencial, para contribuir com programas de melhoramento genético e preservação de germoplasma, pois permite a produção, em larga escala de mudas vigorosas e livres de problemas fitossanitários, garantindo a segurança no transporte de mudas e a implantação de lavouras mais produtivas e sustentáveis (PAIS, 2019; SIVANESAN *et al.*, 2022). Apesar de as palmeiras apresentarem maior dificuldade em responder aos estímulos do cultivo *in vitro* comparado a outras espécies (DU *et al.*, 2020; SILVA-CARDOSO *et al.*, 2020), a embriogênese somática surge como uma alternativa eficaz para a propagação clonal dessas espécies (CARVALHO *et al.*, 2006; MOURA *et al.*, 2009).

No cultivo *in vitro*, o estresse oxidativo, por meio da produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS), é um mecanismo de aceleração do processo de embriogênese somática (GANESAN; JAYABALAN, 2004; LIBIK *et al.*, 2005; KONIECZNY *et al.*, 2008).

O estresse celular, provocado pelas condições adversas do ambiente *in vitro*, combinadas ao uso de reguladores de crescimento, principalmente as auxinas, modula a reprogramação celular (FEHÉR *et al.*, 2003, MIRONOVA *et al.*, 2017). As auxinas sintéticas, como ácido diclorofenoxiacético (2,4D) na dose adequada, podem induzir a embriogênese somática, uma vez que desempenham um papel fundamental nos processos de crescimento e morfogênese das plantas, controlando a aquisição de competência embrionária (FEHÉR *et al.*, 2003, MIRONOVA *et al.*, 2017). Essa competência permite a transição somática para embriogênica (FEHÉR *et al.*, 2003; WÓJCIK *et al.*, 2020).

A composição do meio de cultura é muito importante para o cultivo *in vitro*, uma vez que está relacionada a processos metabólicos essenciais, como a indução de competência embriogênica, a formação e maturação de embriões somáticos, além de impactar o crescimento e a regeneração das plantas resultantes (SALAJ *et al.*, 2014). Atualmente, o uso de meios de cultivo específico, baseado na composição nutricional da espécie, tem apresentado resultados superiores em relação aos tradicionais, como observado para algumas espécies (SAHA *et al.*, 2010; OBERSCHELP *et al.*, 2015; OBERSCHELP *et al.*, 2016). Isso demonstra a necessidade de construir meios específicos para cada espécie e, assim maximizar a resposta calogênica, viabilizando a propagação via embriogênese somática.

Os estudos anatômicos são indispensáveis para a identificação de eventos de aquisição de competência e indução de embriogênese somática, como a identificação de estruturas embriogênicas (SILVA-CARDOSO, 2019). A presença de centros meristemáticos é uma característica marcante de calos embriogênicos, denotando resposta à aplicação de fitormônios ao meio de cultivo (QUIROZ *et al.*, 2006; FEHÉR *et al.*, 2015). Em geral, as células de calos embriogênicos são pequenas, esféricas e agregadas, com elevada relação núcleo/citoplasma, poucos e pequenos vacúolos, organelas abundantes e paredes celulares espessas (ALY *et al.*, 2002; BALZON *et al.*, 2013; SILVA CARDOSO *et al.*, 2019b; CAMPOS *et al.*, 2020). Assim, estudos histológicos são de grande importância para identificar calos embriogênicos e descrever a estrutura de embriões somáticos (ZHANG *et al.*, 2021).

O coquinho azedo (*Butia capitata*) é uma palmeira nativa do Cerrado, sendo que seus frutos quase exclusivamente oriundos da atividade extrativista (FARIA *et al.*, 2008). O extrativismo intenso associado à expansão da fronteira agrícola do Cerrado contribuiu para a inserção da espécie na lista das ameaçadas (SILVA e SCARIOT, 2013; SIBBR,

2020). Isso justifica iniciativas de plantios comerciais mais uniformes, precoces e produtivos da espécie, obtidos por meio da propagação vegetativa.

A embriogênese somática pode ser uma ferramenta viável para propagação da *B. capitata*, porém a etapa inicial do processo, indução de calos, é fundamental e ainda são escassos os trabalhos com espécies lenhosas neotropicais (ISAH, 2016). Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência de diferentes doses de 2,4D em explantes de folhas imaturas *B. capitata*, associadas a um meio de cultivo basal específico, nas respostas calogênicas, procurando responder às seguintes perguntas: i) Qual a dose de 2,4D proporciona a maior formação de calos embriogênicos? Quais são as respostas morfoanatômicas e fisiológicas de explantes de folhas imaturas cultivadas in vitro em meio específico?

4.2.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.2.1 Obtenção das Mudas

As mudas utilizadas no experimento foram produzidas, a partir de sementes de coquinho azedo, coletadas no pomar experimental do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais. A colheita dos frutos ocorreu, quando aproximadamente 30% dos frutos nos cachos estavam maduros, o que foi identificado pela coloração amarela a alaranjada do exocarpo e pela queda natural dos frutos do cacho. Esses foram despulpados mecanicamente e secos à sombra por 15 dias. As sementes foram extraídas dos pirênios (unidade de dispersão: semente + endocarpo) com auxílio de um martelo. Em seguida, as sementes foram imersas em álcool 70% por 5 minutos e lavadas com detergente neutro e água corrente.

Em laboratório, as sementes foram submetidas ao procedimento de superação da dormência, seguindo a metodologia de FIOR *et al.*, (2011). As sementes foram acondicionadas em bandejas de plástico contendo vermiculita autoclavada e umedecida com água destilada a 100% da capacidade de campo. Em seguida, o material foi incubado em câmara B.O.D (Biochemical Oxygen Demand) a 30°C. As plântulas germinadas foram transplantadas para tubetes e mantidas em sementeiras aéreas em casa de vegetação, com temperatura média de 25° por 10 meses, quando atingiram 50 cm de comprimento.

4.2.2.2 Inoculação *in vitro*

As raízes e folhas expandidas das mudas foram removidas, mantendo-se apenas a seção caulinar (folhas imaturas). As folhas foram submetidas à lavagem com detergente neutro e água corrente, sendo desinfetadas em câmara de fluxo laminar, com solução de hipoclorito de sódio a 1% e tríplex lavagem em água destilada e autoclavada. Após a assepsia, foram realizados cortes transversais formando discos e semidiscos de aproximadamente 1 cm de diâmetro e 5 mm de altura (figura 1).

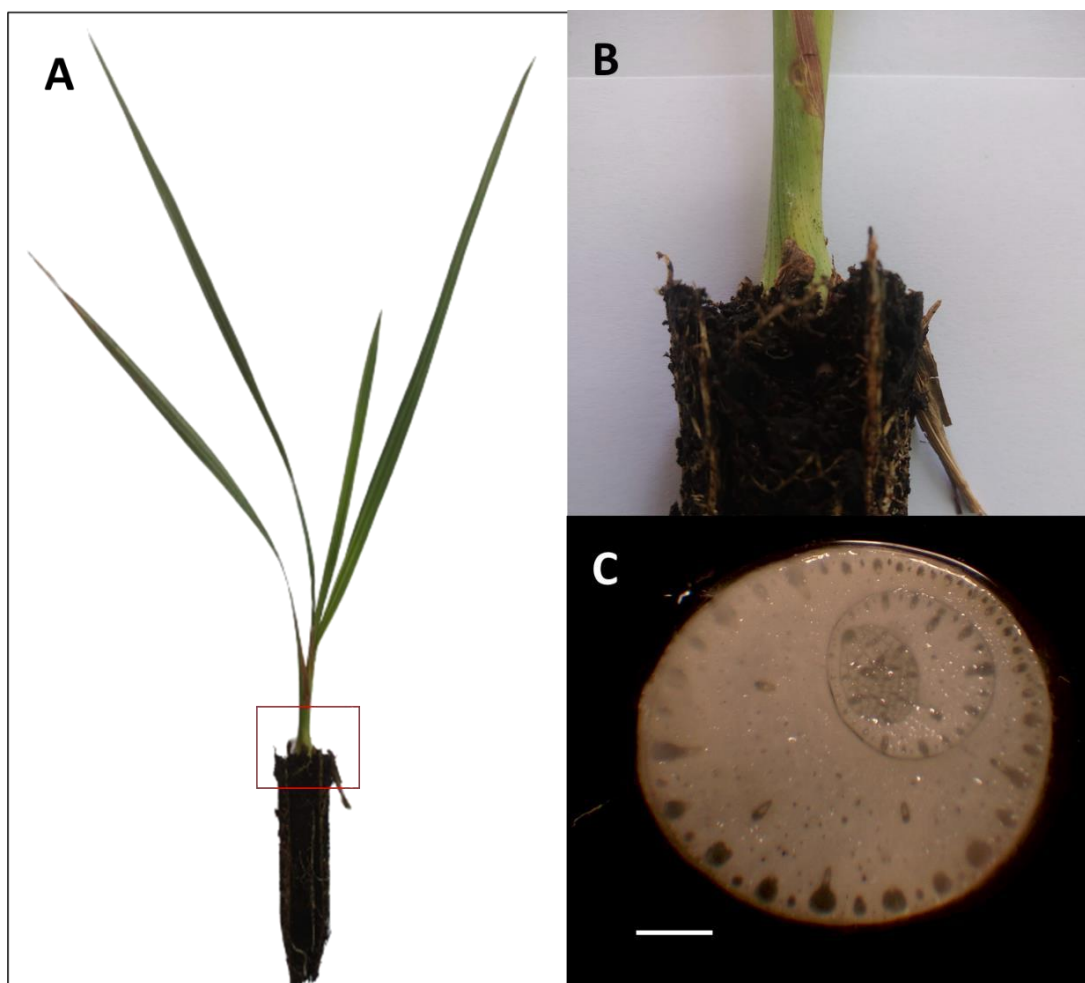


Figura 1- Detalhes morfológicos das mudas de coquinho azedo utilizadas como explantes para o cultivo *in vitro*. (A) Muda de coquinho azedo de aproximadamente 50 cm de comprimento, folhas juvenis. (B) Detalhe da região das bainhas das folhas, realização de cortes transversais (discos) próximos à região meristemática apical. (C) Detalhe dos discos transversais retirando-se a parte clorofilada (explante). Barra: 1 mm.

O meio de cultura basal para macro e micronutrientes utilizado neste experimento foi o meio COQ com metodologia de formulação já descrita no capítulo 1 (Tabela 1). Foi

acrescido ao meio de cultura basal mediante testes preliminares: 3 g.L⁻¹ de carvão ativado, 1 mg.L⁻¹ das vitaminas glicina, ácido nicotínico, piridoxina e tiamina. Também foram adicionados 100 mg.L⁻¹ de arginina, asparagina, glutamina, Myo-inositol e 1000 mg.L⁻¹ de caseína. Para solidificação do meio, utilizaram-se 2,5 g L⁻¹ de Phytigel® (Sigma, USA). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7±0,1, autoclavado a 121 °C por 15 min e 1,3 atm de pressão.

O experimento foi conduzido em DIC, com cinco tratamentos (doses de 2,4 D), quatro repetições e cinco tubos de ensaio por repetição, contendo um explante cada. Utilizaram-se tubos de ensaio de dimensões 12 x 75 mm, contendo 1 mL de meio de cultura. Em função de cada tratamento, foram aplicadas cinco doses de 2,4 D: 0, 100, 200, 300 e 400 µM. O material foi incubado em B.O.D à temperatura de 28° C e na ausência de luz. Após 15, 30, 50 e 75 dias, foram avaliados o número de explantes aparentemente oxidados, considerando pelo menos 50% da área do tecido escurecida, encarquilhados, caracterizado pelo aumento excessivo do volume e ou deformados, com presença de calos.

Tabela 1- Composição meio de cultura COQ (Macro e microelementos), aminoácidos e vitaminas utilizados.

Macronutrientes (mg/L)	
MgSO ₄	162,69
MgCl ₂	39,36
KH ₂ PO ₄	167,42
Ca (NO ₃) ₂	387,18
KNO ₃	432,93
NH ₄ NO ₃	449,35
NaNO ₃	252,98
Micronutrientes (mg/L)	
Fe ₂ SO ₄ .7H ₂ O	27,44
Na ₂ EDTA	28,84
MnSO ₄ .4H ₂ O	10,08
ZnSO ₄ .7H ₂ O	12,30
H ₃ BO ₃	23,72
CuSO ₄ .5H ₂ O	3,62
Vitaminas (mg/L)	
Ácido Nicotínico	1,00
Piridoxina	1,00

Tiamina	1,00
Glicina	1,00
Aminoácidos e outros (mg/L)	
L-Arginina	100
L-Asparagina	100
L-Glutamina	100
Myo-inositol	100
caseína	1000
Carvão ativado	3000

4.2.2.3 Análise de enzimas do estresse oxidativo

No momento da inoculação e 50 dias após, explantes de cada tratamento foram submetidos à análise de enzimas do estresse oxidativo. Foram determinadas as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.11), catalase (CAT, EC 1.11.1.6) e peroxidases (POX, EC 1.11.1.7), conforme metodologia já relatada.

4.2.2.4 Avaliação anatômica

O experimento foi repetido nas mesmas condições para avaliação anatômica. Amostras representativas de cada tratamento foram coletadas e processadas para avaliação em microscopia de luz aos 0, 15, 30, 50 e 75, dias após a inoculação, conforme metodologia já descrita.

4.2.2.5 Análises estatísticas

Os parâmetros de homogeneidade de variância e distribuição normal dos resíduos foram verificados pelo teste LEVENE (LEVENE, 1949) e SHAPIRO-WILK (SHAPIRO; WILK, 1965). Os dados de encarquilhamento e calos foram transformados de acordo com a raiz quadrada de $y + 0,5$. Os dados biométricos de número foram submetidos à análise de variância e ajustes de modelos de regressão, enquanto os das enzimas do estresse oxidativo à análise de variância, ajuste de modelos de regressão e teste de comparação de médias pelo teste Tukey a 5% de significância. Também foi realizada a análise de Componentes Principais e Matriz de correlação de Pearson ($P < 0,05$). Todas essas análises foram realizadas por meio do Programa R (R CORE TEAM, 2021). Nos gráficos, foram apresentadas as médias dos dados não transformados, enquanto os coeficientes de variação e equações do modelo foram estimados com os dados transformados.

4.2.3 RESULTADOS

Para a variável oxidação aparente, não houve diferença significativa entre as doses de 2,4D em nenhum tempo de avaliação, tendo pelo menos 25% dos explantes com mais de 50% de sua área escurecida ao longo de 75 dias de cultivo (Figura 2A). Já no encarquilhamento do explante, doses de 2,4D aplicadas foram superiores ao tratamento controle. Um modelo de regressão quadrático foi ajustado, sendo que a dose de 129,5 μM de 2,4-D proporcionou maior número de explantes encarquilhados (Figuras 2 B, C, Figura 3).

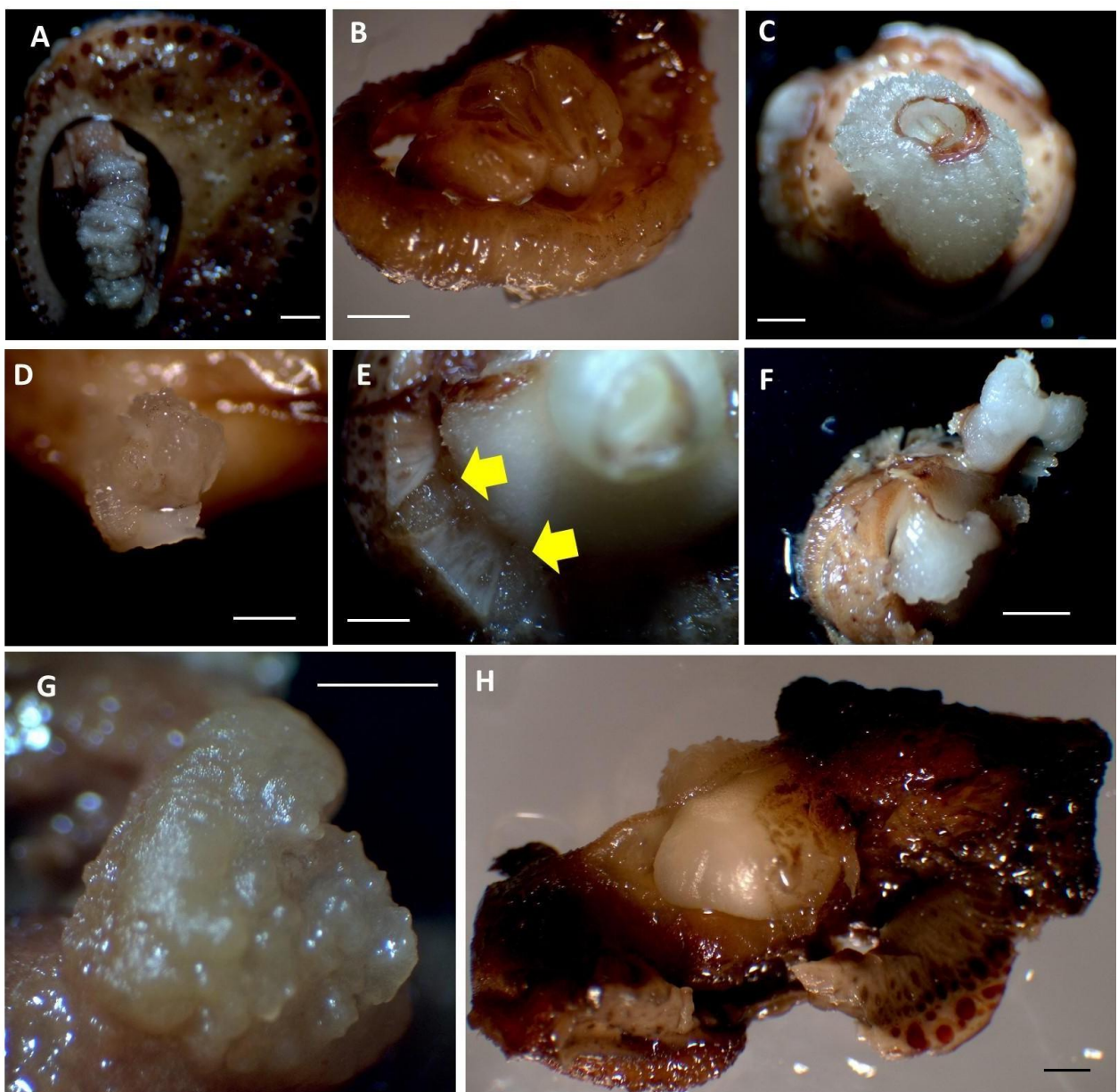


Figura 2- Detalhes dos explantes e calos de *B. capitata* cultivados ao longo de 75 dias. (A) Explante cultivado na dose de 300 μM de 2,4D aos 30 dias com mais de 50% do tecido do explante oxidado, nota-se início de estrutura deformada na região central do explante (encarquilhamento). (B) Explante encarquilhado cultivado na dose de 100 μM de 2,4D aos 30

dias. (C) Explante cultivado na dose 300 μM de 2,4D aos 15 dias, com aumento do volume da região central do explante (encarquilhamento). (D) Explante com calo formado na dose de 400 μM de 2,4D aos 15 dias. (E) explante com presença de saliências com calos friáveis (setas amarelas) cultivado com 300 μM de 2,4D aos 30 dias. (F) Superfície do explante contendo calos formados aos 30 dias na dose de 300 μM de 2,4D. (G e H) Calos aos 75 dias cultivados com 300 e 200 μM de 2,4D, respectivamente. Notar aspecto mais friável do calo (G) e mais compacto do calo (H). Barras 1 mm.

Calos começaram a se formar, aos 15 dias de cultivo (Figuras 2 D, 4A), em todas as doses de 2,4D, à exceção do zero. O aumento na quantidade do regulador de crescimento proporciona acréscimos lineares no número de calos. De forma geral, aos 30, 50 e 75 dias de incubação também as doses de 2,4D aplicadas foram superiores a zero e 100 μM , ajustando-se ao modelo de regressão quadrática (Figuras 2 E, F, G, H, 4 B, C, D). Aos 75 dias de cultivo, a dose de 296 μM de 2,4D foi considerada ótima para a formação de calos, de acordo com o ajuste do modelo de regressão, com $y_{\text{max}} = 2,61$ calos (Figura 5D).

Em todos os tratamentos, foram observados pelo menos dois tipos de calos: um de aspecto mais friável e com muitas estruturas redondas (Figura 2G) e outro de aspecto mais compacto (Figura 2H). De modo geral, os calos friáveis possuíam coloração mais creme, enquanto os mais compactos de coloração mais leitosa.

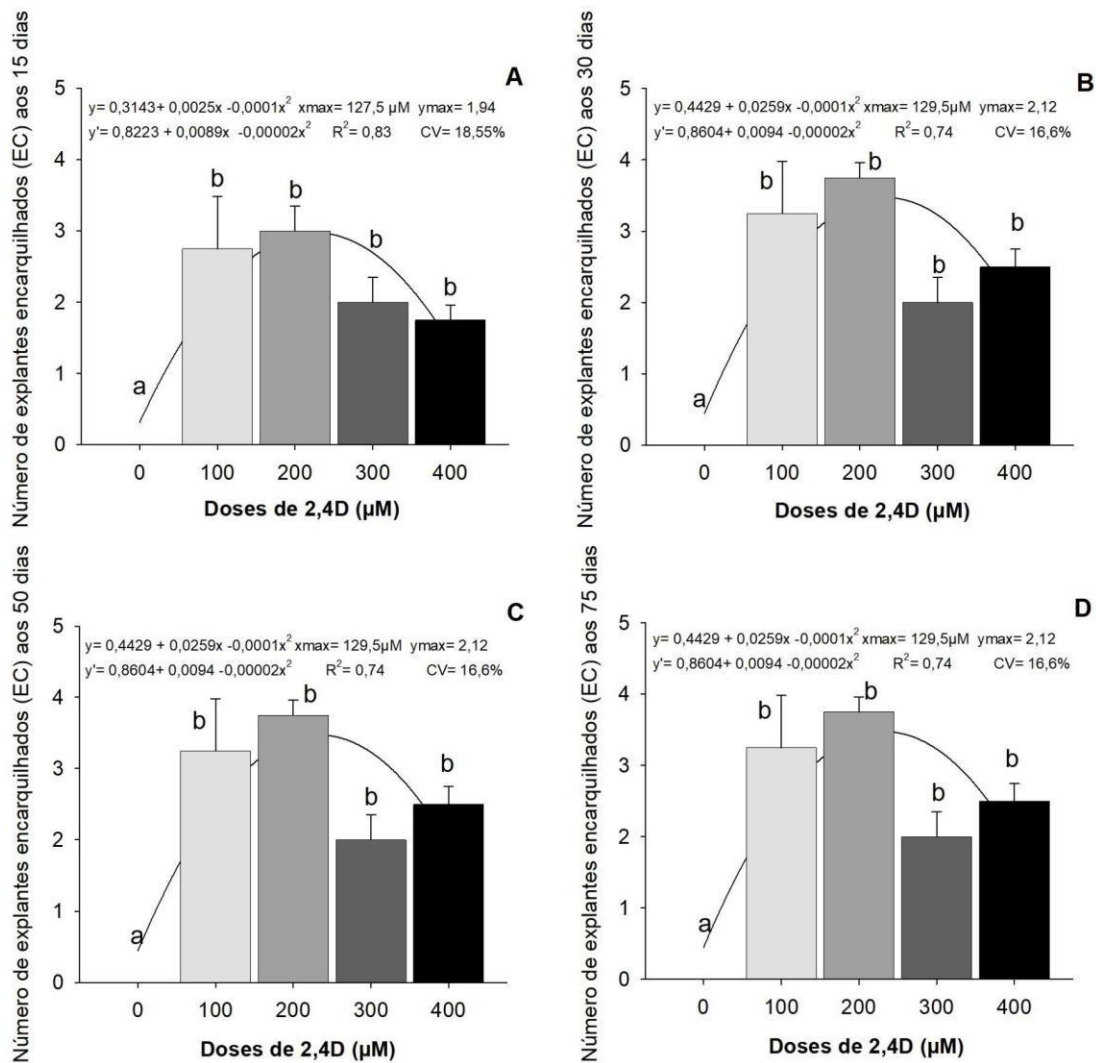


Figura 3- Número médio de explantes que apresentaram encarquilhamento aos 15, 30, 50 e 75 dias de incubação (A, B, C, D). Letras iguais nos tratamentos indicam similaridade pelo teste Tukey a 5% de significância. y' =equação transformada; y = equação não transformada. Para fins de interpretação, os valores das médias são originais e o teste foi baseado nos dados transformados. O coeficiente de variação- CV e R2 foram ajustados com os dados transformados.

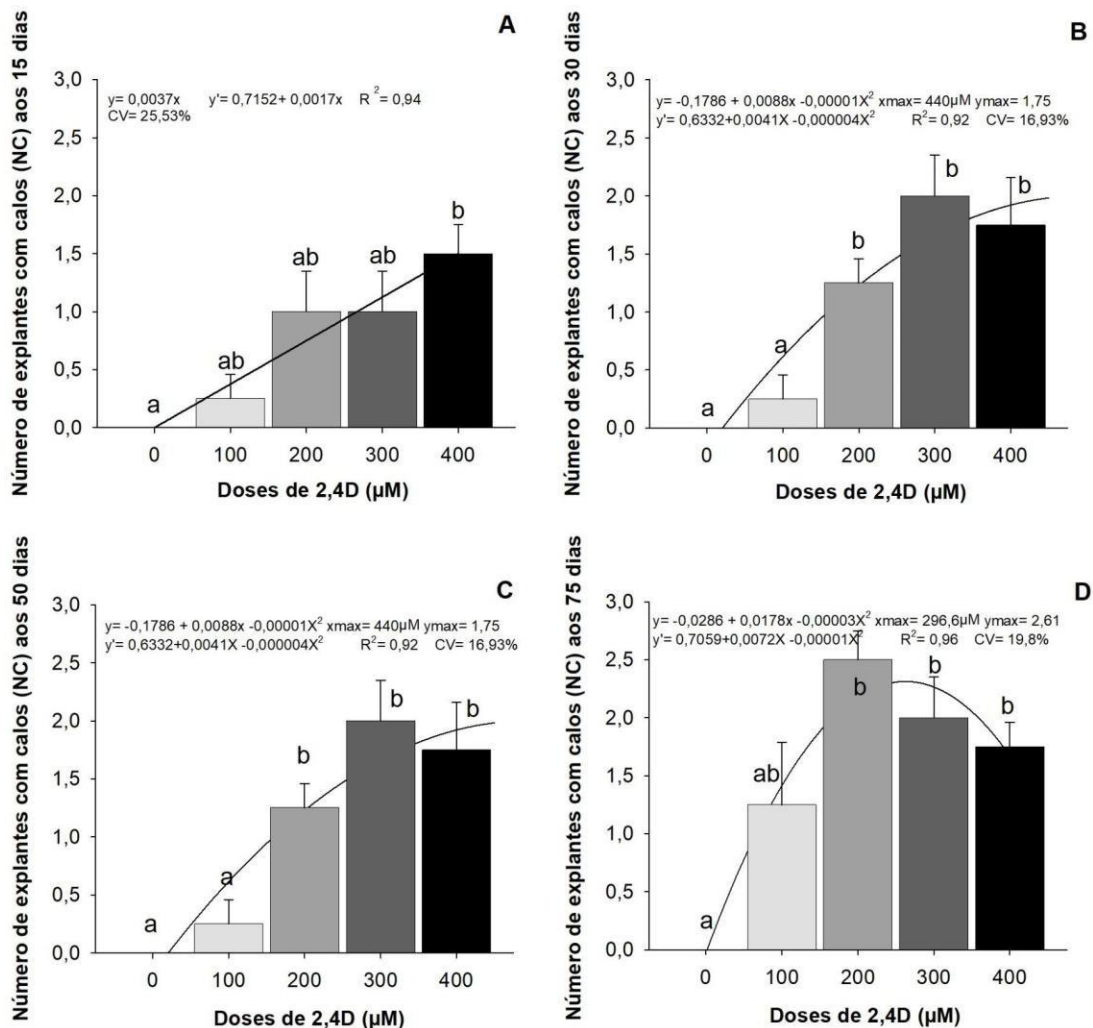


Figura 4- Número médio de explantes de folhas de *B. Capitata* com calos aos 15, 30, 50 e 75 dias de incubação (A, B, C, D). Letras iguais nos tratamentos indicam similaridade pelo teste Tukey a 5% de significância. y' =equação transformada; y = equação não transformada. Para fins de interpretação, os valores das médias são originais e o teste foi baseado nos dados transformados. O coeficiente de variação- CV e R^2 foram ajustados com os dados transformados.

Os dois primeiros componentes principais explicam pelo menos 95% da variação dos dados (Figura 5), logo, demonstra boa representação da dispersão dos escores dos CP no plano bidimensional (CRUZ *et al.*, 2020). As variáveis número de calos e oxidação aos 75 dias pós-cultivo apresentaram correlação superior a 95% com o primeiro componente principal, enquanto a oxidação aos 15 dias relacionou-se (85%) com o segundo componente (Figura 5). A oxidação aparente dos tecidos a partir dos 30 dias de cultivo foi associada com as doses de 300 e 400 µM de 2,4D. Além disso, observa-se

que a formação de calos aos 15, 30 e 50 dias estava associada a oxidação aparente dos tecidos (Figura 5). Isso demonstra que essas características foram as mais importantes para explicar a variação dos dados.

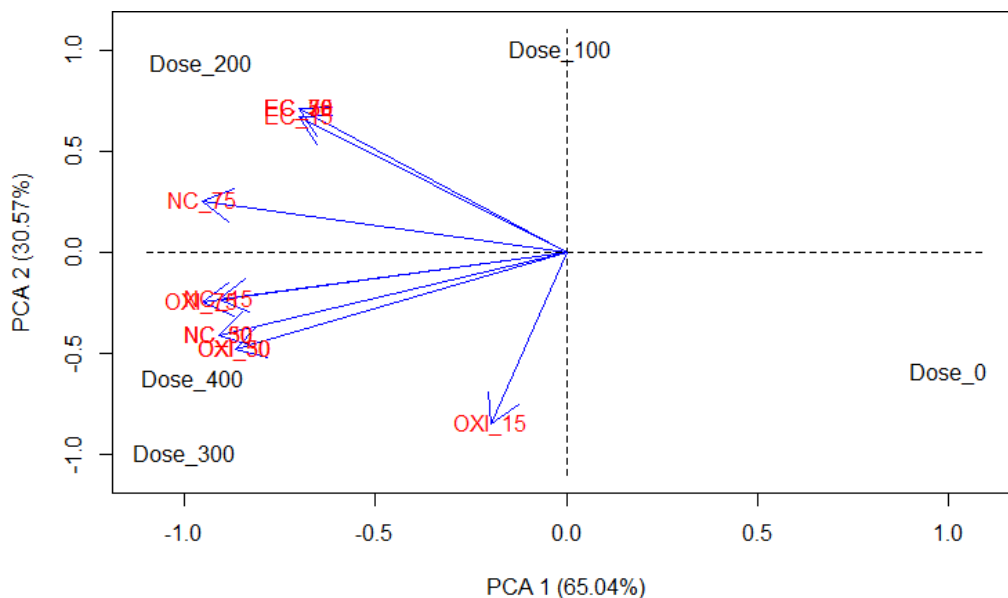


Figura 5- Dispersão gráfica dos dois primeiros componentes principais para as variáveis estudadas no cultivo *in vitro* de explantes de folhas imaturas de *B. Capitata* sob doses de 2,4 D em μM . OXI-15, OXI-30, OXI-50, OXI-75 (número de explantes oxidados aos 15, 30, 50 e 75 dias de cultivo); EC-15, EC-30, EC-50, EC-75 (número de explantes encarquilhados aos 15, 30, 50 e 75 dias de cultivo); NC-15, NC-30, NC-50, NC-75 (número de explantes com presença de calos aos 15, 30, 50 e 75 dias de cultivo).

Foi verificada correlação positiva entre oxidação aos 75 dias e o número de calos formados aos 30, 50 e 75 dias de cultivo. O encarquilhamento, em todas as épocas de avaliação, também obteve correlação positiva com o número de calos formados aos 75 dias (Figura 6).

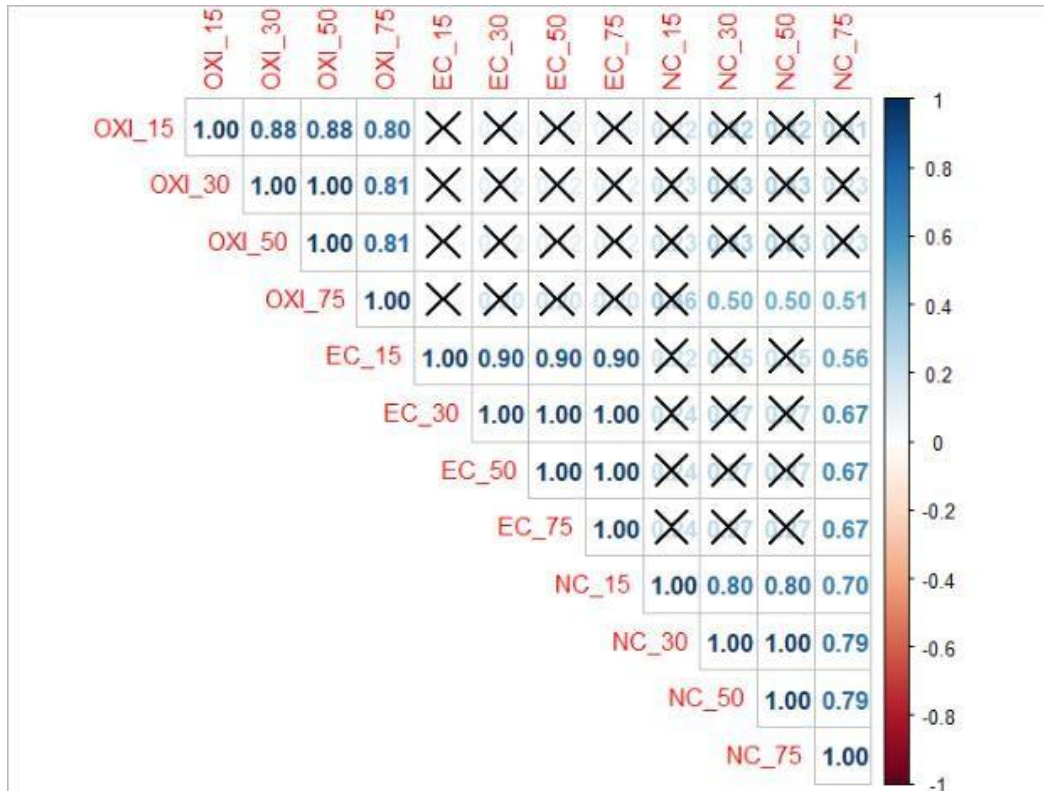


Figura 6- Matriz de correlação de Pearson para as variáveis estudadas no cultivo *in vitro* de explantes de folhas imaturas de *B. Capitata* sob diferentes doses de 2-4D. OXI-15, OXI-30, OXI-50, OXI-75 (número de explantes oxidados aos 15, 30, 50 e 75 dias de cultivo); EC-15, EC-30, EC-50, EC-75 (número de explantes encarquilhados ou intumescidos aos 15, 30, 50 e 75 dias de cultivo); NC-15, NC-30, NC-50, NC-75 (número de explantes com presença de calos aos 15, 30, 50 e 75 dias de cultivo). Valores marcados com “X” correlação não significativa pelo teste t a 5% de significância, valores não marcados com “X” não são significativos pelo teste t a 5% de significância.

Os explantes, antes da inoculação *in vitro*, apresentavam tecidos característicos de regiões meristemáticas, com células pequenas, contendo paredes delgadas, pouco lignificadas, citoplasma denso e vacúolos pequenos ou ausentes, o que sugere alta taxa metabólica, principalmente próximo aos feixes vasculares em formação (setas pretas) (Figuras 7 A, B).

Os calos formados aos 15 dias de cultivo foram visualizados principalmente nas bordas dos explantes. Esses calos primários, originários da epiderme do explante, possuíam células com vacúolos grandes, e pouco densos, além de espaços intercelulares predominantes (Figuras 7 C, D- setas amarelas), envolvidos por células pequenas e justapostas (Figura 7 D-seta vermelha). Regiões do explante, contendo células colapsadas e evidente acúmulo de compostos fenólicos, também foi observada (seta marrom). Os explantes encarquilhados apresentavam células esféricas, com vacúolos grandes e pouco densos. As células multiplicaram, em toda superfície do

explante, mas não se organizaram como os calos, com a presença de centros meristemáticos (setas pretas) ao longo de toda sua superfície e próximo aos feixes vasculares (seta vermelha) (Figuras 7 E, F). Nos feixes vasculares foi verificada algumas células colapsadas na região do protofloema, enquanto aquelas adjacentes ao protoxilema permaneceram ativas, contendo grandes vacúolos, fortemente coradas, indicando maior atividade metabólica (seta verde).

Aos 50 dias de cultivo, os explantes responsivos à calogênese amostrados apresentavam diversos calos, em sua maioria arredondados e de coloração marrom-clara, e, alguns pontos, necrosados (Figura 7 G). Esses calos tiveram sua origem nas proximidades dos tecidos vasculares (Figura 7 H, I – setas vermelhas), registrando a presença de células colapsadas no seu entorno. Os calos apresentaram características típicas de embriogênicos: células pequenas e esféricas, alta relação núcleo/citoplasma e núcleos proeminentes (Figura 7, I).

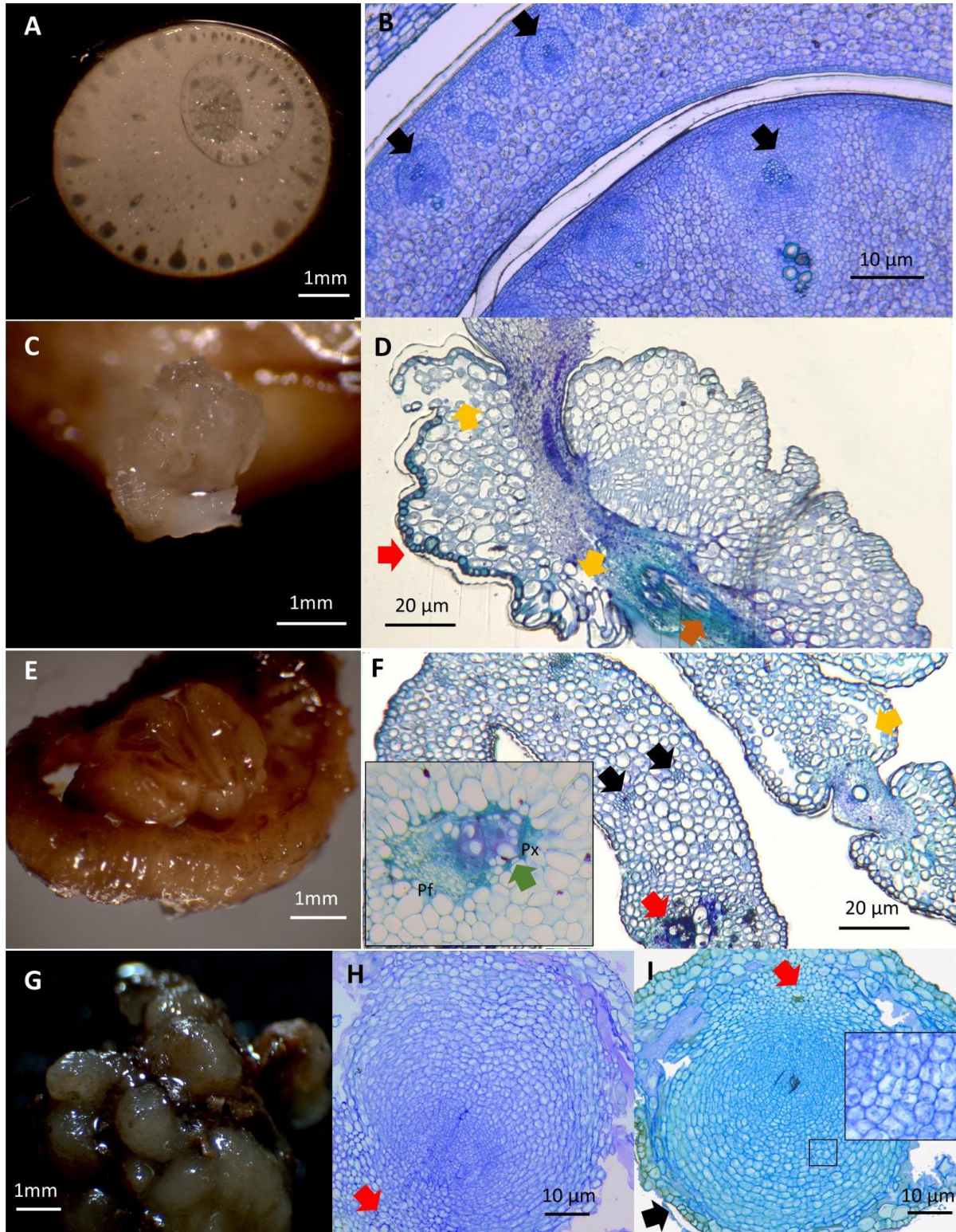


Figura 7- Em A e B detalhes morfológicos e anatômicos dos explantes antes da inoculação *in vitro*. Observar nas setas pretas os feixes vasculares pouco desenvolvidos (folhas jovens). Em C e D, primeiros calos formados na superfície de alguns explantes aos 15 dias de cultivo na dose de 400 μM de 2,4D, a seta laranja indica parte do explante, podendo observar a origem mais epidérmica desses calos. Setas amarelas indicam espaços intercelulares. A seta vermelha indica formação de estrutura semelhante a uma epiderme, notar células pequenas e justapostas. Em E e F detalhes dos explantes encarquilhados aos 30 dias de cultivo na dose de 100 μM de 2,4D. Observar pequenos centros meristemáticos (setas pretas) e multiplicação celular próximo a

feixes vasculares (seta vermelha), que ampliado é possível observar divisões periclinais e anticlinais ao redor dos feixes vasculares com detalhes do protoxilema (px) e protofloema (pf). Observar espaços intercelulares (seta amarela). Em G, H e I calos formados ao longo de 50 dias de cultivo na dose de 300 μ M de 2,4D, sendo perceptível seu crescimento em volta do feixe vascular (setas vermelhas). Observar o colapso das células em volta do calo arredondado e nova epiderme sendo formada (seta preta). Pf- Protofloema, Px- Protoxilema.

Aos 75 dias de cultivo, já era possível observar calos secundários, que se originaram a partir dos calos primários. Esses estavam na forma de aglomerados esféricos ou elípticos de coloração marrom-claro e creme (Figura 8 A), delimitados por células justapostas semelhantes a protoderme (Figura 8 B-setas verdes). Além disso, grande parte dessas estruturas comunicavam-se com outras por meio de suspensórios (Figuras 8B, E- setas vermelhas). Foi detectado o início de desenvolvimento de sistema vascular nessas estruturas, principalmente naquelas que se encontravam mais isoladas com células características do xilema (Figuras 8 B, D, E, F- setas pretas), o que indica a formação de pró-embriões somáticos. O corte transversal das estruturas permitiu a visualização de uma zona meristemática (Figuras 8 G, H- zm), com algumas células em colapso (Figuras 8 G, H) envolvendo a estrutura do pró-embrião.

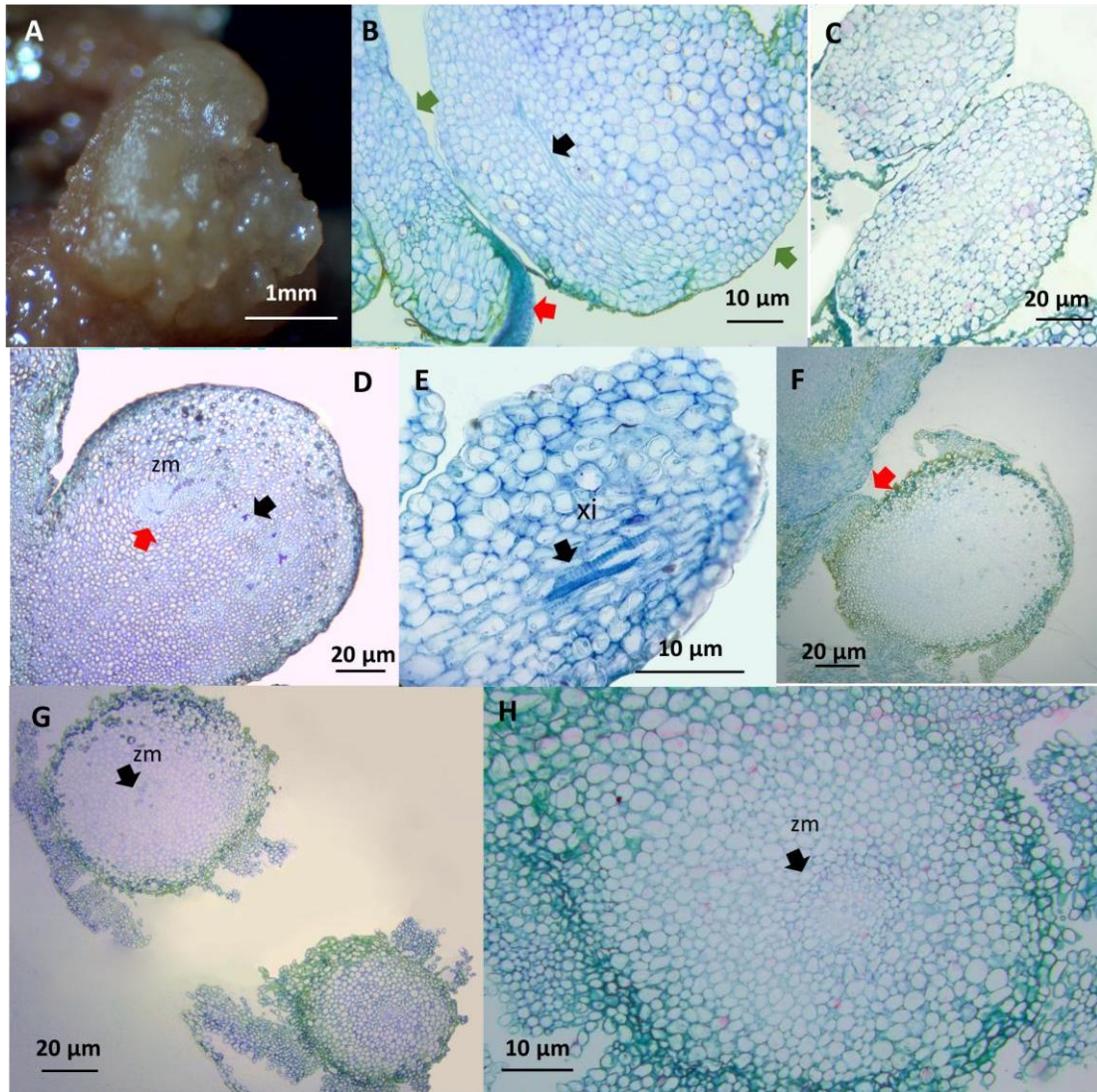


Figura 8- Cortes anômicos dos calos formados após 75 dias de cultivo in vitro de explantes de folha de *B. capitata* sob a dose de $300 \mu\text{M}$ de 2,4-D. (A) Calos formando aglomerados esféricos e de aspecto friável, semelhantes a pró-embriões somáticos. Em B, C, D, E mostram cortes anômicos longitudinais da estrutura apresentada em A, enquanto os cortes F, G e H representam cortes transversais. (B) Estruturas aparentemente isolando-se da estrutura calosa com seta vermelha indicando a conexão da estrutura elipsoide com outras partes do calo, semelhante a um suspensor, enquanto as setas verdes destacam células justapostas que envolvem essas estruturas, sugerindo a formação de uma protoderme. (C) Estruturas redondas isoladas e envoltas por protoderme, indicando desenvolvimento embrionário e vestígios de possível suspensor. (D) Estrutura redonda semelhante a pró-embrião contendo feixes vasculares em formação (seta preta) e uma zona meristemática (zm- seta vermelha) possivelmente correspondente ao eixo embrionário. (E) Estrutura contendo feixe vascular independente com células características de xilema (xi). (F, G, H) Estruturas semelhantes a pró-embriões em corte transversal apresentando zonas meristemáticas centrais (zm) e envoltório de células em colapso oxidativo. zm- zona meristemática; xi- células características de xilema.

4.2.3.1 Enzimas do Estresse Oxidativo

O estado inicial do explante e após 50 dias de cultivo na ausência de 2,4D apresentaram as menores atividades de catalase (CAT), indicando pouca ativação antioxidante sem o estímulo hormonal. Já para as doses de 300 e 400 μM de 2,4D ocorreu aumento significativo da atividade da catalase (Figura 9 A). O ajuste do modelo de regressão foi linear positiva entre a concentração de 2,4-D e a atividade da catalase (CAT), alcançando o valor mais alto em 400 μM .

A peroxidase (POX) teve comportamento semelhante, apesar de inferior à atividade de catalase. A dose de 400 μM de 2,4D também obteve melhor resposta comparado aos outros tratamentos e a observação inicial do explante (Figura 9 B). Houve também tendência linear de aumento da atividade da POX com o aumento das doses de 2,4D, como mostra o ajuste do modelo de regressão linear. Ao contrário, para a enzima SOD não ocorreu diferença significativa entre os tratamentos e ao estado inicial do explante, com menor atividade comparada às outras enzimas (Figura 9 C).

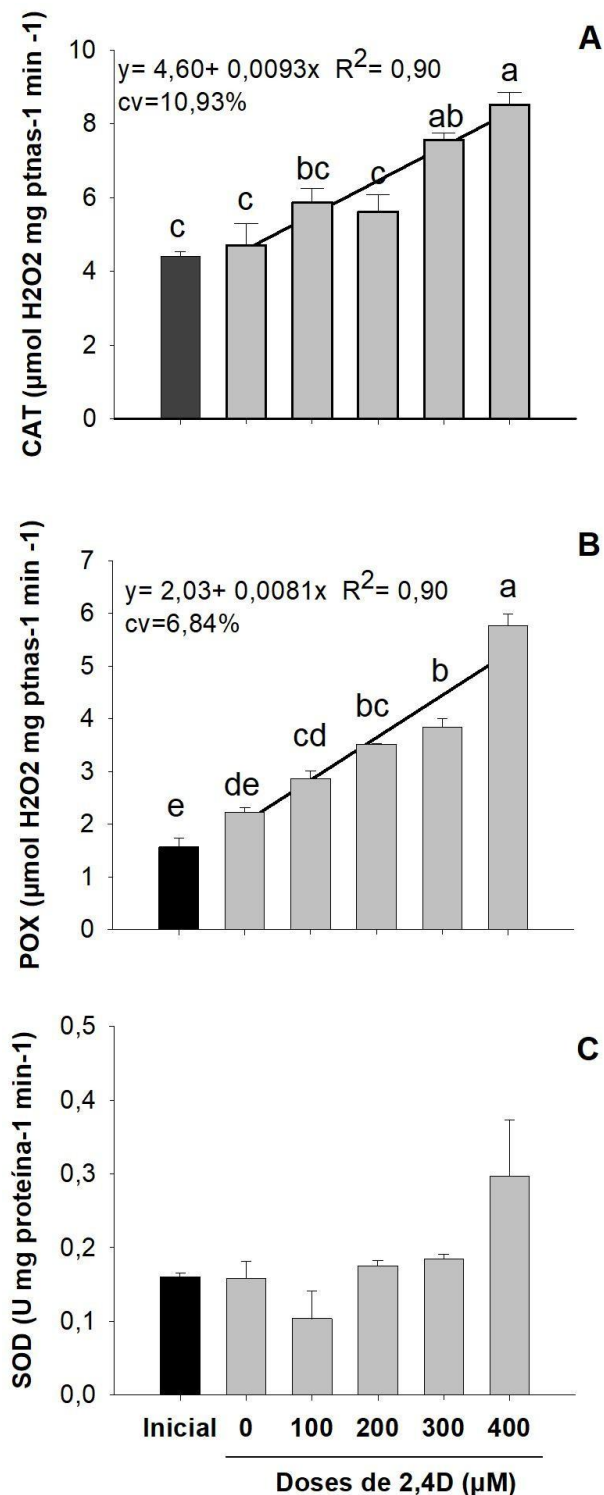


Figura 9- Atividade das enzimas do estresse oxidativo. (A) atividade da catalase (CAT). (B) atividade das peroxidases (POX). (C) atividade da superóxido dismutase (SOD) nos explantes e tecidos cultivados após 50 dias para as doses de 0, 100, 200, 300 e 400 μM de 2,4 D. Letras iguais nos tratamentos indicam similaridade pelo teste Tukey a 5% de significância.

Os dois primeiros componentes principais explicam pelo menos 95% da variação dos dados (Figura 10), logo, demonstra boa representação da dispersão dos escores

dos CP no plano bidimensional (CRUZ *et al.*, 2020). A atividade de CAT, SOD, POX, número de calos e oxidação apresentaram correlação superior a 95% com o primeiro componente principal, com elevada participação dessas variáveis na variabilidade dos dados. As doses de 300 e 400 μM de 2,4D associaram-se com a atividade de enzimas do estresse oxidativo POX e CAT e com o número de calos aos 50 dias de cultivo (Figura 10).

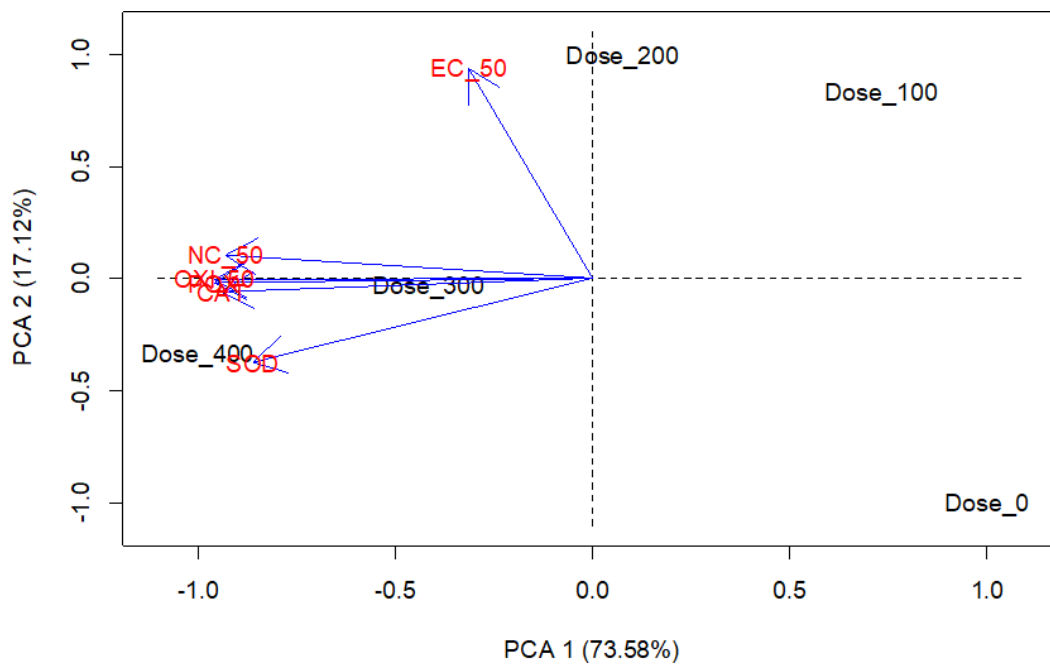


Figura 10- Dispersão gráfica dos dois primeiros Componentes principais (CP) para as variáveis estudadas em relação às diferentes doses de 2,4 D. OXI-50 (número de explantes oxidados aos 50 dias de cultivo); NC-50 (número de explantes com presença de calos aos 50 dias de cultivo); CAT (atividade catalase aos 50 dias de cultivo); POX (atividade peroxidase aos 50 dias de cultivo); SOD (atividade superóxido dismutase aos 50 dias de cultivo).

4.2.4 DISCUSSÃO

4.2.4.1 Respostas morfológicas ao 2,4-D

Embora não haja diferença significativa na oxidação aparente dos explantes nas diferentes doses de 2,4-D, a análise multivariada de Componentes Principais e a correlação de Pearson indicam uma forte relação entre esta variável e a formação de calos (Figuras 5, 6). O estresse oxidativo, mais comumente caracterizada pelo escurecimento e morte dos tecidos, quando moderado e controlado, atua como sinalizador na embriogênese somática e na calogênese (NORTH *et al.*, 2012; PULLMAN *et al.*, 2015; ZAVATTIERI *et al.*, 2010; MARTIN *et al.*, 2018; WÓJCIK *et al.* 2020; GARCIA *et al.*, 2022). Durante a indução de embriogênese somática em *Eucalyptus globulus*, a aplicação de produtos antiescurecimento reduz a quantidade de compostos fenólicos, mas também inibe a embriogênese somática (PINTO *et al.*, 2008). A capacidade de embriogênese somática está fortemente relacionada com a atividade das enzimas oxidases, que causam escurecimento dos tecidos (CAO, 2022). Estudos demonstram que o 2,4-D estimula a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), ativando o sistema antioxidante como resposta adaptativa essencial para a reprogramação celular e o início de eventos morfogênicos (CAMPOS *et al.*, 2020; FERREIRA *et al.*, 2022b).

Por outro lado, na indução de embriogênese somática da espécie *Juglans mandshurica*, as maiores doses de 2,4D exacerbam o escurecimento do explante e inibi a formação de calos, além de elevar muito as atividades das enzimas do sistema antioxidante (LIU *et al.*, 2024). O escurecimento e oxidação excessiva dos tecidos são apontados como um dos principais desafios da cultura de tecidos e ocorre sobretudo em decorrência do estresse que o tecido vegetal se expõe, como: concentração salina, acúmulo de metabólitos, compostos fenólicos e danos mecânicos (NORTH *et al.*, 2012; PULLMAN *et al.*, 2015; GARCIA *et al.*, 2022), o que diverge parcialmente dos dados observados neste estudo. No entanto, a correlação positiva entre a oxidação dos explantes com a formação de calos, reflete um possível estresse benéfico e funcional. Essa peculiaridade pode estar relacionada aos diversos outros fatores que influenciam na indução da embriogênese somática: genótipo do explante, tipo de explante, efeitos fisiológicos, efeitos hormonais e epigenéticos (VARIS *et al.*, 2018; HAPSORO *et al.*, 2020). Isso reitera que é necessário um equilíbrio entre oxidação dos tecidos para que a indução de embriogênese somática aconteça.

A diferença significativa no encarquilhamento em função das doses de 2,4-D nos primeiros dias de cultivo e sua correlação com o número de calos aos 75 dias, confirma que os tecidos respondem fisiologicamente ao fito-hormônio antes do início da calogênese. A adição de 2,4-D promove resposta significativa crescente do encarquilhamento dos explantes, até a dose de 129,5 μM , de acordo com o ajuste do modelo de regressão (Figura 3). O encarquilhamento são as primeiras mudanças morfológicas ocasionadas pela ativação da divisão celular no processo de desdiferenciação, eventos esperados no início da calogênese (VON ARNOLD *et al.*, 2002). A associação entre o encarquilhamento e a ação de reguladores de crescimento, especialmente o 2,4-D, já é registrado na literatura, inclusive mencionando que precede a formação de calos (FERREIRA *et al.*, 2005). O inchaço das flores nas espiguetas de tamareira são os primeiros passos na formação do calo, sendo outro exemplo de relação entre a modificação do explante e a calogênese (SOLANGI *et al.* 2023). Nesse contexto, os dados obtidos corroboram a função do 2,4-D como desencadeador de processos de desdiferenciação celular e reorganização morfogenética nos tecidos vegetais. Esse conhecimento contribui para o refinamento de protocolos de embriogênese somática e pode ser aplicado em diferentes espécies. Perspectivas futuras incluem o aprofundamento da análise anatômica e molecular desses tecidos para confirmar a correlação entre encarquilhamento e competência embriogênica, ampliando a compreensão sobre os mecanismos envolvidos na indução *in vitro*.

O 2,4-D é eficaz na indução de calos em *B. capitata*, sendo a dose de 296 μM a mais responsiva aos 75 dias, de acordo com o ajuste do modelo de regressão quadrática (Figuras 4). Calos primários são formados em 361,99 μM de 2, 4D e 50 μM Picloram em meio Y3 com explantes de embriões zigóticos de *Butia odorata*, porém não atingem sucesso na regeneração de plântulas, já que boa parte dos embriões somáticos se apresentam-se fundidos (CAMPOS *et al.*, 2020). Nesse sentido, é importante destacar que o uso de 2,4D, apesar de eficiente na fase de indução, na maturação do embrião pode ser tóxico e comprometer a regeneração de plântulas (GARCIA *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2021).

A aquisição da competência embriogênica está diretamente relacionada à desdiferenciação celular, que, por sua vez, exige a ativação de divisões celulares sucessivas (FEHÉR *et al.*, 2003; WÓJCIK *et al.*, 2020). Esse processo é essencial para manter o destino celular dentro do novo programa voltado à indução de embriões, tanto na embriogênese somática direta quanto na indireta (VON ARNOLD *et al.*, 2002). As

células embriogênicas competentes são células que se encontram em um estado intermediário entre somático e embriogênico (YANG e ZHANG 2010). Na prática, a desdiferenciação pode ser observada por meio de centros de divisões celulares marcados por células jovens e em estados de multiplicação.

A resposta calogênica em diferentes doses de 2,4D é bastante importante para contribuir com o desenvolvimento de um protocolo de embriogênese somática de *B. capitata*. O 2,4D é amplamente utilizado no processo, em geral, em mais de 78% dos protocolos de embriogênese somática, inclusive, predominando em plantas da família das palmeiras (WÓJCIK *et al.* 2020). Esse fitorregulador promove efeito duplo importante, ao mesmo tempo que desencadeia a produção de ácido indol-3-acético (AIA) endógeno, também, é um importante indutor de estresse celular, modulando a reprogramação das células via metilação do DNA nuclear (KARAMI e SAID 2010). O acúmulo de auxina endógena, especialmente ácido indol-3-acético (AIA) é a chave para mudar o destino das células dos tecidos somáticos e estabelecer uma base para os processos embriogênicos (FEHÉR *et al.*, 2003; WÓJCIK *et al.*, 2020; GARCIA *et al.*, 2022; ASGHAR *et al.*, 2023).

4.2.4.2 Anatomia e sistema antioxidante

A partir de 50 dias de cultivo ocorrem características embriogênicas nos calos e, aos 75 dias, evidências importantes da formação de pró-embriões (Figuras 4 C, D, 7 G, 8). Os resultados estão de acordo com a base teórica que caracteriza as estruturas embriogênicas: células pequenas, esféricas e agregadas, com parede celular espessa, elevada relação núcleo/citoplasma, poucos e pequenos vacúolos e organelas abundantes (ALY *et al.*, 2002; FEHÉR *et al.*, 2003; BALZON *et al.* 2013; SILVA-CARDOSO *et al.*, 2019; CAMPOS *et al.*, 2020). A origem perivascular de calos com potencial embriogênico também são verificadas em outras espécies de palmeiras *Acrocomia aculeata* (MEIRA *et al.*, 2020) e *Euterpe precatoria* (FERREIRA *et al.*, 2022). As evidências de embriogênese somática observadas aos 75 dias de cultivo (Figura 7, 8) também estão de acordo com a literatura, que ressalta como características marcantes de embriões somáticos em desenvolvimento, o isolamento de estruturas globosas com sistema vascular independente do explante (VON ARNOLD *et al.*, 2002; HORSTMAN *et al.* 2017; DU *et al.*, 2020). A identificação de possíveis suspensores nos cortes anatômicos também corroboram para evidências embriogênicas, uma vez que os embriões somáticos primários se ligam ao explante, por meio de uma estrutura composta

por células do parênquima, arranjadas compactamente, denominada suspensor, que desaparecem no período tardio da embriogênese somática (DU *et al.*, 2020).

Portanto, os resultados no presente estudo confirmam a competência embriogênica em folhas imaturas de *B. capitata*, fornecendo bases teóricas para micropropagação da *B. capitata*. No entanto análises mais aprofundadas precisam ser realizadas para determinar se essas estruturas globulares se tratam de forma inequívoca de embriões somáticos.

4.2.4.3 Enzimas do Estresse Oxidativo

A calogênese requer um equilíbrio entre a indução de estresse oxidativo e a capacidade antioxidante dos tecidos. Os níveis intermediários do sistema antioxidante, representados pela atividade de CAT e POX, coincidiram com as doses intermediárias de 2,4-D testadas e com a formação de calos (Figura 9). Paralelamente, os dados bioquímicos demonstram elevação nas atividades das enzimas antioxidantes CAT e POX com o aumento das concentrações de 2,4-D e também associação via Componentes Principais com a formação de calos e oxidação visual dos tecidos (Figura 10).

A formação de calos em explantes cultivados com 2,4-D está associada a um aumento gradativo na atividade antioxidante, representada pela CAT e POX, evidenciando que níveis moderados de estresse oxidativo podem ser determinantes para a indução da calogênese. O aumento das doses de 2,4D provoca aumento progressivo da atividade enzimática ligadas à CAT e POX. Essas enzimas têm a função de minimizar os efeitos tóxicos do peróxido de hidrogênio, quebrando a molécula em água e oxigênio, sendo ativadas quando as células enfrentam algum tipo de estresse (RIAZ *et al.*, 2018). Por isso, a quantificação da catalase pode auxiliar no monitoramento do sistema antioxidante celular diante de possíveis quadros de estresse (BLAZQUEZ, 2009). Isso indica que o 2,4D está atuando como ativador do sistema antioxidante celular por gerar estresse *in vitro*.

O aumento das atividades da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT) nos estágios iniciais da embriogênese somática induzida com 2,4D e BAP, sugere que um nível adequado de estresse oxidativo é requerido para desencadear determinada rota morfológica (BLAZQUEZ *et al.*, 2009). Isso está de acordo também com estudos que indicam que o H₂O₂, em associação com o ciclo ascorbato-glutationa (ASC-GSH), está relacionado à manutenção da plasticidade da parede celular e à promoção de uma

divisão celular organizada (DE GARA *et al.*, 1997). Ambos os processos são necessários durante os estágios iniciais da embriogênese somática.

As mudanças nas atividades enzimáticas antioxidantes são apontadas como marcadores para os diferentes estágios da embriogênese somática em plantas (BAGNOLI *et al.* 1998). O nível e o tipo de ROS são fatores determinantes que induzem genes de defesa e respostas adaptativas, enquanto, em concentrações mais elevadas, desencadeiam um programa de morte celular geneticamente controlado (VAN BREUSEGEM *et al.*, 2001). FOYER (2005) sugere até a mudança do termo estresse oxidativo para “sinalização oxidativa”, em função da importância dessa resposta para mecanismos cujas células vegetais detectam o ambiente e fazem os ajustes apropriados na expressão genética, no metabolismo e na fisiologia.

As massas pró-embriogênicas acumulam compostos fenólicos em alta concentração e, após 30 dias de cultivo, causam o escurecimento das estruturas e, conseqüentemente, a formação de embriões (ÁVILA-VICTOR 2023). Nesse sentido, na embriogênese somática, são identificadas atividades das peroxidases, demonstrando mais uma vez o papel da oxidação como marcador e sinalizador de processos de embriogênese somática (PERNIS 2023). Portanto os resultados do presente trabalho indicam que o 2,4-D promove um ambiente celular propício à formação de calos, possivelmente, por meio da indução controlada de estresse. Assim, existe um nível ótimo de estresse oxidativo necessário para a indução da calogênese, no qual a resposta antioxidante contribui para a reprogramação celular e a desdiferenciação dos tecidos. No entanto mais estudos são necessários, para elucidar o papel do sistema antioxidante e indução de calogênese e embriogênese somática de *B. capitata*, o que talvez seja a chave para desvendar a alta recalcitrância das palmeiras nos processos de cultivo *in vitro*.

4.2.5 CONCLUSÃO

O 2,4D é eficiente para promover formação de calos com potencial embriogênico em plântulas de *B. capitata*. A dose de 296 µM de 2,4D induz a maior formação de calos em explantes do tipo discos de folhas imaturas de *B. capitata*. A atividade antioxidante, aos 50 dias de cultivo, associa-se com a calogênese, principalmente nas doses intermediárias de 2,4D. Os resultados são promissores para nortear outros estudos de embriogênese somática em coquinho azedo. Este trabalho é o primeiro a descrever os

processos iniciais de indução de embriogênese somática para o coquinho azedo, oferecendo uma nova perspectiva para futuras pesquisas na área com espécies ainda pouco estudadas e contribuindo para o desenvolvimento de diversas tecnologias agrícolas.

4.2.6 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J.A.S.; SILVAROLLA, M.B. Induction of somatic embryos of *Coffea arabica* genotypes by 6-benzyladenine. **International Journal of Plant Developmental Biology**, v.3, p.5-9, 2009. Disponível em: [http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/0906/IJPDB_3\(1\)/IJPDB_3\(1\)5-9o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/0906/IJPDB_3(1)/IJPDB_3(1)5-9o.pdf)

ALY, M.A.M.; RATHINASABAPATHI, B.; KELLEY, K. Somatic embryogenesis in perennial static *Limonium bellidifolium*, Plumbaginaceae. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.68, p.127-135, 2002. DOI <https://doi.org/10.1023/A:1013803031374>

ANDRADE, A *et al.* Explant age and genotype drive the somatic embryogenesis from leaf explants of *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.(Arecaceae), an alternative palm crop for oil production. **Trees**, v. 38, n. 2, p. 315-326, 2024. DOI <https://doi.org/10.1007/s00468-023-02484-4>

ANDERSON, M.D; PRASAD, T.K, STEWART, C.R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidases, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. **Plant Physiology**, v.109, n.4, p.1247-1257, 1995. DOI <https://doi.org/10.1104/pp.109.4.1247>

ASGHAR, S., GHORI, N., HYAT, F., LI, Y., & CHEN, C. Use of auxin and cytokinin for somatic embryogenesis in plants: a story from competence towards completion. **Plant Growth Regulation**, v. 99, n.3, p. 413–428., 2023. DOI <https://doi.org/10.1007/s10725-022-00923-9>

ÁVILA-VICTOR, V. M. C; ORDAZ-CHAPARRO, M; ARJONA-SUÁREZ; DONJUAN-IRAHETA, L; GOMÉZ-MERINO, F.C. In Vitro Mass Propagation of Coffee Plants (*Coffea arabica* L. var. Colombia) through Indirect Somatic Embryogenesis. **Plants**, v.12, n.6, p. 1237, 2023. DOI <https://doi.org/10.3390/plants12061237>

BAGNOLI F, CAPUANA M, RACCHI NL. Developmental changes in catalase and superoxide dismutase isoenzymes in zygotic and somatic embryos of horse chestnut. **Funct Plant Biol**, v. 25, n.8, p. 909–913, 1998. DOI <https://doi.org/10.1071/PP98068>

BALZON, T. A; LUIS, Z. G; SCHERWINSKI-PEREIRA JE. New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. **In Vitro Cell Dev**, v.49, n.1, p. 41-50, 2013. DOI <https://doi.org/10.1007/s11627-012-9479-3>

BEAUCHAMP, C., e FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, n.1, p. 276–287, 1971. DOI [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)

BLAZQUEZ, S., OLMOS, E., HERNÁNDEZ, J. A. FERNÁNDEZ-GARCÍA, N.,

FERNÁNDEZ, J. A., & PIQUERAS, A. (2009). Somatic embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.). Histological differentiation and implication of some components of the antioxidant enzymatic system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.97, n.1, p. 49–57, 2009. DOI <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9497-y>

CAO, X., GAO, F., QIN, C., CHEN, S., CAI, J., SUN, C., WENG, Y., & TAO, J. Optimizing Somatic Embryogenesis Initiation, Maturation and Preculturing for Cryopreservation in *Picea pungens*. **Forests**, v. 13, n.12, p. 2097, 2022. DOI <https://doi.org/10.3390/f13122097>

CAMPOS, S. S. DE, SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. BERND, R. B., FIOR, C. S., & SCHWARZ, S. F. Somatic embryogenesis as an alternative for in vitro multiplication of *Butia odorata* from mature zygotic embryos. **Anais Da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92 (supp1), p.1–13, 2020. DOI <https://doi.org/10.1590/0001-3765202020181215>

CARVALHO, J. M. F. C; SILVA M. M. DE A; MEDEIROS, M. J. L. Fatores inerentes à Micropropagação. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 28. (Embrapa Algodão. Documentos, 148). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/276578/1/DOC148.pdf>

CHANCE, B., & MAEHLY, A. C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v.2, p.764–775, 1955. DOI [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(55\)02300-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(55)02300-8)

CHOI YE, YANG DC, PARK JC, SOH WY & CHOI KT. Regenerative ability of somatic single and multiple embryos from cotyledons of Korean ginseng on hormone-free medium. **Plant Cell Rep**, v 17, p. 544–551, 1998. DOI <https://doi.org/10.1007/s002990050439>

CHRISTIANSON, M. L; WARNICK, D. A. Competence and Determination in the Process of *in vitro* Shoot organogenesis. **Developmental Biology**, v. 95, ed.2, p. 288-293, 1983. DOI [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(83\)90029-5](https://doi.org/10.1016/0012-1606(83)90029-5)

CRUZ, C.D.; FERREIRA, F.M.; PESSONI, L. A. *Biometria aplicada ao estudo de Diversidade Genética*. 2 ed. Viçosa: Editora UFV, 2020. 614p

D. GAJ, M. Direct somatic embryogenesis as a rapid and efficient system for in vitro regeneration of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 64, p. 39–46, 2001. DOI <https://doi.org/10.1023/A:1010679614721>

DE GARA L, DE PINTO MC, ARIGONI D. Ascorbate sintesis and ascorbate peroxidase activity during the early stage of wheat germination. **Physiol Plant**, v. 100, p. 894–900, 1997. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb00015.x>

DU, Y., CHENG, F., & ZHONG, Y. Induction of direct somatic embryogenesis and shoot organogenesis and histological study in tree peony (*Paeonia* sect. Moutan). **Plant Cell**,

Tissue and Organ Culture, v.141, n.3, p. 557–570, 2020. DOI <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01815-4>

DUCROCQ, C., SANGWAN, RS, e SANGWAN-NORREEL, BS. Production of Agrobacterium-mediated transgenic fertile plants by direct somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Datura innoxia*. **Plant Molecular Biology**, v. 25, n.6, p. 995–1009, 1994. DOI <https://doi.org/10.1007/BF00014673>

EEUWENS, C. J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured in vitro. **Physiologia Plantarum**. v. 36, p. 23-28, 1978. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1976.tb05022.x>

ELHITI, M.; STASOLLA, C.; WANG, A. Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. V. 49, p. 631-642, 2013. DOI <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9547-3>

FARIA, J.P., ALMEIDA, F., SILVA, L.C.R., VIEIRA, R.F., AGOSTINI-COSTA, T.S. Chemical characterization of pulp of *Butia capitata* var *capitata*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n. 3, p. 827–829, 2008. DOI <https://doi.org/10.1590/S0100-29452008000300045>

FEDER, N; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, v.55, p. 123–142, 1968. DOI <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1968.tb06952.x>

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. DOI <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.07.005>

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to na embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.74, p.201-228, 2003. DOI <https://doi.org/10.1023/A:1024033216561>

FERREIRA, J. C. B. DE ARAÚJO SILVA-CARDOSO, I. M; DE OLIVEIRA MEIRA, R; SCHERWINSKI PEREIRA, J.E. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of the palm tree *Euterpe precatoria* Mart. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 148, p. 667–686, 2022a. DOI <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02227-2>

FERREIRA, J. C. B. DE ARAÚJO SILVA-CARDOSO, I. M., MEIRA, R. O. DA SILVA COSTA, F. H., & SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Towards development of an efficient somatic embryogenesis protocol for the palm tree *Euterpe precatoria* (Mart.) from leaf tissues of adult plants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 58, n.5, p.750–768, 2022b. DOI <https://doi.org/10.1007/s11627-022-10310-8>

FERREIRA, R.G.M *et al.* Indução de embriogênese somática em cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, n.3, p.500-503, 2005.

DOI <https://doi.org/10.1590/S0100-29452005000300038>

FIOR, C. S, RODRIGUES, L. R, LEONHARDT, C., SCHWARZ, S. Superação de dormência em sementes de *Butia capitata*. **Ciência Rural**, v. 41, n. 7, p. 1150-1153, 2011. DOI <https://www.scielo.br/j/cr/a/wD3pM7q7TLcCxQdRDmkqYxF/>

FISHER, A. C., KAMGA, M. H., AGARABI, C., BRORSON, K., LEE, S. L., YOON, S. The Current Scientific and Regulatory Landscape in Advancing Integrated Continuous Biopharmaceutical Manufacturing. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 253–267, 2019. DOI <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.08.008>

FOYER, C. H., NOCTOR, G. (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant, Cell & Environment**, v. 28, n. 8, p. 1056–1071, 2005. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01327.x>

GALLEGO, P; MARTIN, L; BLAZQUEZ, A; GUERRA, H; VILLALOBOS, N. Involvement of peroxidase activity in developing somatic embryos of *Medicago arborea* L. Identification of an isozyme peroxidase as biochemical marker of somatic embryogenesis. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, n.2, p. 78–84, 2014. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.09.017>

GANESAN, M.; JAYABALAN, N. Evaluation of haemoglobin (erythrocyte): for improved somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR 2). **Cell Biology and Morphogenesis**, v. 23, p. 181-187, 2004. DOI <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0822-y>

GARCIA, C., FURTADO DE ALMEIDA, A. A., COSTA, M., BRITTO, D., VALLE, R., ROYAERT, S., & MARELLI, J. P. Abnormalities in somatic embryogenesis caused by 2,4-D: an overview. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.137, n.2, p. 193–212, 2019. DOI <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01569-8>

GARCIA, C; ALMEIDA, F.A.A; BRITTO, D; CORREA. P.M; SILVA, L; SILVA, J; ROYAERT, S; MARELLI, P, J. Single-base resolution methylomes of somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* L. reveal epigenome modifications associated with somatic embryo abnormalities. **Scientific Reports**, v.12, n1, p.1-19, 2022. DOI <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18035-9>

GREER, M. S; KOVALCHUK, I; EUDES, F. Ammonium nitrate improves direct somatic embryogenesis and biolistic transformation of *Triticum aestivum*. **New Biotechnology**, v. 26, ed. (1–2), p. 44–52, 2009. DOI <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2009.02.003>

GROLL J, MYCOCK DJ, GRAY VM. Effect of medium salt concentration on differentiation and maturation of somatic embryos of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Annals of Botany**, v. 89, ed.5, p. 645–648, 2002. *Ann Bot* 89:645–648. DOI <https://doi.org/10.1093/aob/mcf095>

HAPSORO, D., HAMIRANTI, R., AND YUSNITA, Y. In vitro somatic embryogenesis of superior clones of robusta coffee from Lampung, Indonesia: Effect of genotypes and callus induction media. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 21, p. 3811–3817, 2020. DOI <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210849>

HORSTMAN, A., BEMER, M., BOUTILIER, K. A transcriptional view on somatic embryogenesis. **Regeneration**. v.4, p. 201–216, 2017. DOI <https://doi.org/10.1002/reg2.91>

ISAH, T. Induction of somatic embryogenesis in woody plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, n.38, p.118, 2016. DOI <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2134-6>

KARAMI, O., SAIDI, A. The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. **Molecular Biology Reports**, v. 37, p. 2493–2507, 2010. DOI <https://doi.org/10.1007/s11033-009-9764-3>

KIM, Y. W, MOON, H. K. Enhancement of somatic embryogenesis and plant regeneration in Japanese larch (*Larix leptolepis*). **Plant Cell Tiss Organ** v. 88, p. 241–245, 2007. DOI <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9202-y>

KINTZIOS, S., DROSSOPOULOS, J.B. & LYMPEROPOULOS, C. Effect of vitamins and inorganic micronutrients on callus growth and somatic embryogenesis from leaves of chilli pepper. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 67, p. 55–62, 2001. DOI <https://doi.org/10.1023/A:1011610413177>

KONIECZNY, R.; LIBIK, M.; TULEJA, M.; NIEWIADOMSKA, M. Oxidative events during in vitro regeneration of sunflower. **Acta Physiol Plant**, v. 30, p. 71–79, 2008. DOI <https://doi.org/10.1007/s11738-007-0092-8>

KOTHARI SL, AGARWAL K, KUMAR S. Inorganic nutrient manipulation for highly improved in vitro plant regeneration in finger millet—*Eleusine coracana* (L.) Gaertn. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 40, p. 515–519, 2004. DOI <https://doi.org/10.1079/IVP2004564>

KUMAR, V., VAN STADEN, J. New insights into plant somatic embryogenesis: an epigenetic view. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.39, p.194, 2017. DOI <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2487-5>

LEVENE, H. On a Matching Problem Arising in Genetics. **Ann. Math. Statist**, v. 20, n.1, p. 91 - 94, 1949. DOI <https://doi.org/10.1214/aoms/1177730093>

LIBIK, M.; KONIECZNY, R.; PATER, B.; SLESIAK, I.; MISZALSKI, Z. Differences in the activities of some antioxidant enzymes and in H₂O₂ content during rhizogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of the ice plant. **Plant cell rep.**, v. 23, p. 834–841, 2005. DOI <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0886-8>

LIU, C., LI, A., FAN, X., QIN, B., ZHANG, L. Explant browning during callus induction of *Juglans mandshurica* might be caused by the cooperation of PAL, polyphenol and PPO. **South African Journal of Botany**, v. 174, p. 937-945, 2024. DOI <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2024.09.072>

LIU, H; ZHANG, H; DONG, Y. X; HAO, Y. J; ZHANG, X. S. DNA METHYLTRANSFERASE1-mediated shoot regeneration is regulated by cytokinin-induced cell cycle in *Arabidopsis*. **New Phytologist**, v. 217, p. 219–232, 2018. DOI <https://doi.org/10.1111/nph.14814>

MAGNANI, E.; JIMÉNEZ-GÓMEZ, J.; SOUBIGOU-TACONNA, L.; LEPINIEC, L.; FIUME, E. Perfil do início da embriogênese somática em *Arabidopsis*. **BMC Genomics**, v.18, p. 998, 2017. DOI <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4391-1>

MALLICK, N; MOHN, F. H. Reactive oxygen species: response of algal cells. **Journal of Plant Physiology**, v. 157, n.2, p.183-193, 2000. DOI [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(00\)80189-3](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(00)80189-3)

MANIVANNAN, A., JANA, S., SOUNDARARAJAN, P., KO, C. H., & JEONG, B. R. Antioxidant enzymes metabolism and cellular differentiation during the developmental stages of somatic embryogenesis in “*Torilis japonica*” (Houtt.) DC. *Plant Omics*, v.8, n5, p.461–471, 2015. DOI <https://search.informit.org/doi/10.3316/informit.516864120146941>

MARISOL OCHOA-VILLARREAL, HOWAT, S., HONG, S. M. JANG, M. O., JIN, Y. W., LEE, E. K., LOAKE, G. J. Plant cell culture strategies for the production of natural products. **BMB Reports**, v.49, n.3, p. 149–158, 2016. DOI <https://10.5483/BMBRep.2016.49.3.264>

MARTIN, F. *et al.* Overexpression of EcGSH1 induces glutathione production and alters somatic embryogenesis and plant development in *Hevea brasiliensis*. **Ind Crops Prod**, v. 112, p. 803–814, 2018. DOI <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.12.057>

MAZRI, M. A., BELKOURA, I., MEZIANI, R., MOKHLESS, B., NOUR, S. Somatic embryogenesis from bud and leaf explants of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Najda. **3 Biotech**, v.7, n. 58, p.1-9, 2017. DOI <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0676-y>

MAZRI, M. A; MEZIANI, R; BELKOURA I; MOKHLESS, B; NOUR, S. A combined pathway of organogenesis and somatic embryogenesis for an efficient large-scale propagation in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Mejhoul. **3 Biotech**, v.8, n.4, p. 215, 2018. DOI <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1235-x>

MEIRA, F; LUIZ, Z. G; SILVA-CARDOSO, I.M.A; SCHEWINSKI-PEREIRA, J. E. Somatic embryogenesis from leaf tissues of macaw palm [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart]. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 92, n.3, e20180709, 2020. DOI <https://doi.org/10.1590/0001-3765202020180709>

MÉNDEZ-HERNÁNDEZ, H. A *et al.* Signaling Overview of Plant Somatic Embryogenesis.

Frontiers in Plant Science, v.10, p.77, 2019. DOI <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00077>

MIRONOVA, W. TEALE, M. SHAHRIARI, J. DAWSON, K. PALME. The Systems Biology of Auxin in Developing Embryos. **Trends Plant Sci**, v. 22, n.3, p. 225-235, 2017. DOI <https://10.1016/j.tplants.2016.11.010>

MONTORO, P; ETIENNE, H; CARRON, M. P. Effect of calcium on callus friability and somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* Mull. Arg. relations with callus mineral nutrition, nitrogen metabolism and water parameters. **Journal of Experimental Botany**, v. 46, n.2, p. 255–261, 1995. DOI <https://doi.org/10.1093/jxb/46.2.255>

MOURA, E.F; MOTOIKE, S.Y; VENTRELLA, M. C; DE SÁ JÚNIOR, A.Q; CARVALHO, M. Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. **Scientia Horticulturae**, v.119, ed.4, p. 447-454, 2009. DOI <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.08.033>

MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n.3, p.473–497, 1962. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

NAMASIVAYAM, P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v.90, p.1–8, 2007. DOI <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9249-9>

NEVA AC. Plant microtechnique: a note on rapid tissue dehydration. **J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc**, v. 47, n.6, p.459, 1958. DOI <https://doi.org/10.1002/jps.3030470623>. PMID: 13549298.

NORTH, J. J; NDAKIDEMI PA, LAUBSCHER, C. P. Effects of antioxidants, plant growth regulators and wounding on phenolic compound excretion during micropropagation of *Strelitzia reginae*. **International Journal of the Physical Sciences**, v.7, n.4, p.638–646, 2012. DOI DOI: <https://doi.org/10.5897/IJPS11.786>

OBERSCHELP GPJ, GONÇALVES AN, CALDERAN MENEGHETTI E, MENDES GRANER E, ALMEIDA M (2015) Eucalyptus dunnii Maiden plant regeneration via shoot organogenesis on a new basal medium based on the mineral composition of young stump shoots. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 51, p.626-636, 2015. DOI <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9715-8>

OBERSCHELP, G.P.J., GONÇALVES, A.N. Assessing the effects of basal media on the *in vitro* propagation and nutritional status of *Eucalyptus dunnii* Maiden. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.52, p. 28–37, 2016. DOI <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9740-7>

OLIVARES-GARCÍA, C. A. et al. Phenylpropanoids are connected to cell wall fortification and stress tolerance in avocado somatic embryogenesis. **International journal of**

molecular sciences, v. 21, n. 16, p. 5679, 2020. DOI <https://doi.org/10.3390/ijms21165679>

PAIS, M. S. Somatic Embryogenesis Induction in Woody Species: The Future After OMICs Data Assessment. **Frontiers in Plant Science**, v.10, p.240, 2019. DOI <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00240>

PAIVA, É.ÀS, PINHO, SZD, OLIVEIRA, DMT. Large Plant Samples: How to Process for GMA Embedding?. In: Chiarini-Garcia, H., Melo, R. (eds) Light Microscopy. Methods in Molecular Biology. **Humana Press, Totowa, NJ**, v.689, p.37-49, 2011. DOI https://doi.org/10.1007/978-1-60761-950-5_3

PASTERNAK, T. P.; AYAYDIN, E. P. F.; MISKOLCZI, P.; POTTERS, G.; ASARD, H.; ONCKELEN, H. A. V.; DUDITS, D.; FEHÉR, A. The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. **Plant Physiology**, v. 129, p. 1807-1819, 2002. DOI <https://doi.org/10.1104/pp.000810>

PEIXOTO P.H.P *et al.* Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, n.3, p.137-143, 1999. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Aluminum-effects-on-lipid-peroxidation-and-on-theP.H.P.-Cabraia/d64d82f7bfe69796a15024820e4f35e173285a3e>

PERNIS, M; SALAJ, T; BELLOVÁ, J; DANCHENKO, M; BARÁTH, P; KLUBICOVÁ, K. Secretome analysis revealed that cell wall remodeling and starch catabolism underlie the early stages of somatic embryogenesis in *Pinus nigra*. **Front. Plant Sci**, v.14, p.1225424, 2023. DOI <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1225424>

PINTO, G; SILVA, S; PARK, Y. S; NEVES, L; ARAÚJO, C; SANTOS, C. Factors influencing somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globulus* Labill.: basal medium and anti-browning agents. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 95, p. 79-88, 2008. DOI <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9418-5>

POLESI, L.G *et al.* Comparative proteomic analysis and antioxidant enzyme activity provide new insights into the embryogenic competence of *Guadua chacoensis* (Bambusoideae, Poaceae). **Journal of Proteomics**, v. 273, p. 104790, 2023. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2022.104790>

PRUDENTE, D.O., DE SOUZA, L. & PAIVA, R. Plant Somatic Embryogenesis: Modulatory Role of Oxidative Stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences Natl**, v. 90, p. 483–487, 2020. <https://doi.org/10.1007/s40011-019-01136-3>

PULLMAN, G. S; ZENG, X; COPELAND-KAMP, B; CROCKETT, J; LUCREZI, J; MAY, S. W; BUCALO, K. Conifer somatic embryogenesis: Improvements by supplementation of medium with oxidation-reduction agents. **Tree Physiology**, v.35, n.2, p. 209–224,

2015. DOI <https://doi.org/10.1093/treephys/tpu117>

QUIROZ FIGUEROA; F. R.; ROJAS HERRERA, R.; GALAZ AVALOS, R. M.; LOYOLA VARGAS, V.M. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 86, p. 285-301, 2006. DOI <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9139-6>

R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2019. Disponível em: <https://www.R-project.org/>

RIAZ, M *et al.* Boron alleviates the aluminum toxicity in trifoliolate orange by regulating antioxidant defense systems and reducing root cell injury. **Journal of Environmental Management**, v.208, p.149–158, 2018. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.12.008>

SAHA, P; BANDYOPADHYAY, S; RAYCHAUDHURI, S. Formulation of Nutrient Medium for In Vitro Somatic Embryo Induction in *Plantago ovata* Forsk. **Biological Trace Element Research**, v. 140, p. 225–243, 2011. DOI <https://doi.org/10.1007/s12011-010-8684-3>

SAHRAWAT AK, CHAND S. Stimulatory effect of copper on plant regeneration in indica rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Plant Physiology**, v.154, n.4, p.517–522, 1999. DOI [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(99\)80292-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(99)80292-2)

SALAJ, L; FRÁTEROVÁ, M; CÁRACH, J; SALAJ, SLOVAK. The effect of culture medium formulation on *Pinus nigra* somatic embryogenesis. **Dendrobiology**, v.71, p.119-128, 2014. DOI <http://dx.doi.org/10.12657/denbio.071.012>

SAMSON, N. P; CAMPA, C; LE GAL, L; NOIROT, M; THOMAS, G; LOKESWARI, T. S; KOCHKO A. Effect of primary culture medium composition on high frequency somatic embryogenesis in different *Coffea* species. **Plant Cell, Tissue and Organ**, v. 86, p. 37–45, 2006. DOI <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9094-2>

SHAPIRO, S.S; WILK, M.B; An analysis test for normality (complete samples). *Biometrika*, v.52, p.591-611, 1965. DOI <https://doi.org/10.1093/biomet/52.3-4.591>

SIBBR (Sistema de informação sobre a biodiversidade brasileira). Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil e Lista da Flora do Brasil, 2020. Disponível em: <https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/284398>. Acesso em fevereiro de 2025.

SILVA-CARDOSO, I.M.A; MEIRA, F. S; GOMES, A.C.M.M; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Anatomy and histochemistry of somatic embryogenesis of *Syagrus oleracea* from immature inflorescences. **Crop Breed Appl Biotechnol**, v.19, n.4, p.444–450, 2019. DOI <https://doi.org/10.1590/1984-70332019v19n4n62>

SILVA-CARDOSO, I. M; MEIRA, F. S; GOMES, A. C. M. M; SCHERWINSKI-PEREIRA,

J. E. Histology, histochemistry and ultrastructure of pre-embryogenic cells determined for direct somatic embryogenesis in the palm tree *Syagrus oleracea*. **Physiologia Plantarum**, v. 168, n.4, p. 845–875, 2020. DOI <https://doi.org/10.1111/ppl.13026>

SILVA-CARDOSO, I.M.A; MEIRA, F. S; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. (2022). The maturity level of explant plays a key role in somatic embryogenesis of the palm tree *Syagrus oleracea* [Mart.]. **Acta Physiologiae Plantarum**, v44, n.87, p1-17. DOI <https://doi.org/10.1007/s11738-022-03420-8>

SILVA, P.A.D; SCARIOT, A. Phenology, biometric parameters and productivity of fruits of the palm *Butia capitata* (Mart.) Beccari in the Brazilian cerrado in the north of the state of Minas Gerais. **Acta Botanica Brasilica**, v. 27, p. 580-589, 2013. DOI <https://doi.org/10.1590/S0102-33062013000300015>

SIVANESAN, I; NAYEEM, S; VENKIDASAMY, B; KUPPURAJ, S. P; RN, C; SAMYNATHAN, R. Genetic and epigenetic modes of the regulation of somatic embryogenesis: a review. **Biologia Futura**, v.73, n.3, p. 259–277, 2022. DOI <https://doi.org/10.1007/s42977-022-00126-3>

SIVILAY, P., CHOI, Y. E. Somatic embryogenesis from the thin cell layer cultures of zygotic and somatic embryos of *Aesculus hippocastanum*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 60, p. 67–74, 2024. DOI <https://doi.org/10.1007/s11627-023-10396-8>

SOLANGI, N et al. Factors influencing somatic embryogenesis and plantlet regeneration of date palm using immature floral buds. *Sarhad Journal of Agriculture*, v. 9, n. 2, p. 323-331, 2023. DOI <https://dx.doi.org/10.17582/journal.sja/2023/39.2.323.331>

SU, W. W; HWANG, W. I; KIM, S. Y; SAGAWA, Y. Induction of somatic embryogenesis in *Azadirachta indica*. **Plant Cell Tiss Org** v. 50, p. 91–95, 1997. DOI <https://doi.org/10.1023/A:1005891113815>

SUN, J; WANG, M. J; DING, M. Q; DENG, S. R; LIU, M. Q, LU, C. F; ZHOU, X. Y; SHEN, X; ZHENG, X. J; ZHANG, Z. K; SONG, J. H₂O₂ and cytosolic Ca²⁺ signals triggered by the PM H⁺-coupled transport system mediate K⁺/Na⁺ homeostasis in NaCl-stressed *Populus euphratica* cells. **Plant, Cell and Environmen**, v. 33, p. 943–958, 2010. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02118.x>

VAN BREUSEGEM, F. M; VRANOVA, E; DAT, J. F; INZE, D. The role of active oxygen in plant signal transduction. **Plant science**, v. 161, n. 3, p. 405-414, 2001. DOI [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00452-6](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00452-6)

VARIS, S; KLIMASZEWSKA, K; ARONEN, T. Somatic embryogenesis and plant regeneration from primordial shoot explants of *Picea abies* (L.) H. Karst. somatic trees. **Front. Plant Sci**, v.9, p. 1551, 2018. DOI <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01551>

VON ARNOLD, S., SABALA, I., BOZHKOVA, P. *et al.* Vias de desenvolvimento da

embriogênese somática. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, n.3, p. 233–249, 2002. DOI <https://doi.org/10.1023/A:1015673200621>

WHITE, PHILIP R. A Handbook of Plant Tissue Culture. **Soil Science**, v.56, n.2, p. 151,1943. Disponível em: https://journals.lww.com/soilsci/citation/1943/08000/a_handbook_of_plant_tissue_culture.10.aspx

WILLIAMS EG, MAHESWARAN G. Somatic Embryogenesis: Factors Influencing Coordinated Behaviour of Cells as an Embryogenic Group. **Annals of Botany**, v. 57 n.4, p. 443–462, 1986. DOI <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087127>

WÓJCIK, A.M; WÓJCIKOWSKA, B; GAJ, M. D. Current perspectives on the auxin mediated genetic network that controls the induction of somatic embryogenesis in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v.21, n.4, p.1333, 2020. DOI <https://doi.org/10.3390/ijms21041333>

WU, X. M; KOU, S. J; LIU, Y. L; FANG, Y. N; XU, Q; GUO, W. W. Genomewide analysis of small RNAs in nonembryogenic and embryogenic tissues of citrus: microRNA-and siRNA-mediated transcript cleavage involved in somatic embryogenesis. **Plant Biotechnology Journal**. V.13, p. 383-394, 2015. DOI <https://doi.org/10.1111/pbi.12317>

YANG, X. Y; ZHANG, X. L. Regulation of Somatic Embryogenesis in Higher Plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 29, n.1, p. 36–57, 2010. DOI <https://doi.org/10.1080/07352680903436291>

ZAVATTIERI, M. A; FREDERICO, A. M; LIMA, M; SABINO, R; ARNHOLDT-SCHMITT, B. Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.13, p.12–13, 2010. DOI <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-34582010000100012>

ZHANG, M; WANG, A; QIN, M; QIN, X; YANG, S; SU, S; SUN, Y; ZHANG, L. Direct and Indirect Somatic Embryogenesis Induction in *Camellia oleifera* Abel. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p.1–14, 2021. DOI <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.644389>