

HERBICIDAS AUXÍNICOS NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE
Euterpe edulis Martius - ESPÉCIE SÍMBOLO DA FLORESTA
ATLÂNTICA

LUCIANO BESTETE OLIVEIRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
OUTUBRO – 2021

HERBICIDAS AUXÍNICOS NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE
Euterpe edulis Martius - ESPÉCIE SÍMBOLO DA FLORESTA
ATLÂNTICA

LUCIANO BESTETE OLIVEIRA

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Produção Vegetal”

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Virginia Silva Carvalho

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
OUTUBRO – 2021

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

048

Oliveira, Luciano Bestete.

HERBICIDAS AUXÍNICOS NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE *Euterpe edulis* MARTIUS -
ESPÉCIE SÍMBOLO DA FLORESTA ATLÂNTICA / Luciano Bestete Oliveira. - Campos dos
Goytacazes, RJ, 2021.

82 f. : il.

Inclui bibliografia.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense
Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2021.

Orientadora: Virginia Silva Carvalho.

1. Juçara. 2. propagação *in vitro*. 3. 2,4-D. 4. picloram. 5. embriões somáticos. I.
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

HERBICIDAS AUXÍNICOS NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE
Euterpe edulis Martius - ESPÉCIE SÍMBOLO DA FLORESTA
ATLÂNTICA

LUCIANO BESTETE OLIVEIRA

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Produção Vegetal”

Aprovada em 18 de outubro de 2021

Comissão Examinadora:

Prof. Vanildo Silveira (D. Sc., Biotecnologia) - UENF

Prof. Sávio da Silva Berilli (D. Sc., Produção Vegetal) - IFES

Prof. Rodrigo Sobreira Alexandre (D. Sc., Fitotecnia) - UFES
(Coorientador)

Prof^a. Virginia Silva Carvalho (D. Sc., Fitotecnia) - UENF
(Orientadora)

À minha esposa, Janaína. Às minhas filhas, Ludimila e Maria Clara e a meu filho,
Murillo. Família Unida é Família Ungida. Amo vocês!!!

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e por mais essa oportunidade.

Aos meus pais, Valtair de Oliveira e Dejanira Bestete Oliveira, por minha formação nos princípios da verdade e honestidade.

À minha esposa, Janaína, pelo amor incondicional, pelo carinho, pela compreensão, pelo estímulo e pelos incentivos, mesmo nos momentos mais difíceis. Obrigado meu amor!

Às minhas filhas, Ludimila e Maria Clara e a meu filho Murillo, razão de minhas conquistas, meus amores, vivo para vocês.

À minha sogra, Ieda, que sempre me apoiava. Saudades!!

Aos meus familiares, que torceram e oraram pela realização desta etapa em minha vida. Obrigado a todos!

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e ao Instituto Federal do Espírito Santo (IFES), particularmente ao Campus de Alegre, pela parceria e suporte na realização do Programa de Doutorado Interinstitucional em Produção Vegetal (DINTER).

À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e ao Departamento de Engenharia Florestal e da Madeira, pela disponibilização do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais.

À professora Virginia Silva Carvalho, pela orientação valiosa, pelo incentivo, pela amizade e pela confiança demonstrada na condução deste trabalho. Amizade para a vida!

Ao professor, Rodrigo Sobreira Alexandre, pela coorientação, incentivo, pela confiança e principalmente pela amizade. Pela disponibilização do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais para realização dos experimentos.

Aos professores Adésio Ferreira e João Paulo Bestete de Oliveira pela ajuda imprescindível nas análises estatísticas e pelas orientações às mesmas.

Ao professor Clóvis Eduardo Nunes Hegedus, por nos oportunizar o acesso às matrizes e coleta dos frutos de *Euterpe edulis*, em sua propriedade, para construção deste trabalho.

Aos professores, Vanildo Silveira, Claudete Santa-Catarina, Eliemar Campostrini e Victor Paulo Mesquita Aragão, pelas críticas e sugestões na qualificação e defesa de projeto.

Aos demais professores e alunos do DINTER, pelos ensinamentos transmitidos no decorrer do curso e pelas amizades construídas.

À equipe do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Tamyris, Yanara, Ingridh, Thuanny, Caroline e Julcinara, pela ajuda na montagem dos experimentos e pela amizade construída.

À equipe do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Laboratório de Fitotecnia da UENF, pela ajuda e disponibilidade.

À equipe do Laboratório de Biotecnologia do Instituto Federal do Espírito Santo, campus Alegre, na pessoa dos professores Tércio da Silva de Souza e Luciano Menini e aos técnicos Jaqueline Rodrigues Cindra de Lima Souza e Adriano Azevedo Merson. O meu muito obrigado pela disponibilidade do laboratório e pela ajuda imprescindível de cada um.

À equipe do Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins, da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), na pessoa dos professores Breno Valentim Nogueira e Marco Cesar Cunegundes Guimarães e aos técnicos Tadeu Ériton Caliman Zanardo e Flávio Cunha Monteiro. Obrigado pelas análises de microscopia eletrônica de varredura e orientações às mesmas e por nos receber tão bem.

Aos professores da Universidade Federal do Espírito Santo, Antônio César Bozzi e Josemberg Silva Baptista, pela disponibilização da utilização do microscópio estereoscópio digital de alta resolução para captura de imagens.

À equipe do Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), na pessoa do professor

Wagner Campos Otoni e a pós-doutoranda, Lorena Melo Vieira, pelas análises de anatomia e orientação às mesmas. O meu muito obrigado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo acesso à informação de pesquisas e pesquisadores na Plataforma Lattes.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro essencial para a realização desta pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) (EDITAL FAPES/CNPq Nº 05/2017 - PRONEm - PROGRAMA DE APOIO A NÚCLEOS EMERGENTES. Contrato registrado no SICONV sob o nº 794009/2013 e Processo FAPES nº 72660945.

Às demais pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, o meu especial agradecimento.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1 OBJETIVO GERAL.....	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1 <i>Euterpe edulis</i>	5
3.2 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA <i>IN VITRO</i>	7
3.3 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA.....	10
3.4 HERBICIDAS AUXÍNICOS: 2,4-D E PICLORAM NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE <i>Euterpe edulis</i>	12
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 MATERIAL VEGETAL E DESINFESTAÇÃO DOS EXPLANTES.....	16
4.2 INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA.....	18
4.3 DIFERENCIAÇÃO E MATURAÇÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS.....	19
4.4 GERMINAÇÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS.....	19
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	21
4.6 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA MICROSCOPIA.....	22
4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA: MEV.....	22
4.8 ANÁLISES HISTOLÓGICAS E ESTRUTURAIS.....	23

5. RESULTADOS	24
5.1 INDUÇÃO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA (ES).....	24
5.2 DIFERENCIAÇÃO E MATURAÇÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS.....	30
5.3 GERMINAÇÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS.....	33
6. DISCUSSÃO	35
6.1 INDUÇÃO DA ES.....	35
6.2 DIFERENCIAÇÃO E MATURAÇÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS.....	40
6.3 GERMINAÇÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS.....	43
7. RESUMO E CONCLUSÕES	45
8. RECOMENDAÇÕES	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

RESUMO

OLIVEIRA, Luciano Bestete; D. Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; outubro de 2021; Herbicidas auxínicos na embriogênese somática de *Euterpe edulis* Martius - espécie símbolo da Floresta Atlântica; Orientador: D. Sc. Virginia Silva Carvalho; Co-orientador: D. Sc. Rodrigo Sobreira Alexandre.

A palmeira *Euterpe edulis* possui apenas crescimento meristemático primário e não forma perfilhos, impedindo a propagação vegetativa por métodos convencionais, tornando a propagação *in vitro*, em especial a embriogênese somática (ES), uma das alternativas à espécie. Neste contexto, objetivou-se analisar os fitorreguladores 2,4-D e picloram (PIC) na fase de indução e seu efeito residual nas demais fases da ES de *E. edulis*. Na fase de indução, utilizou-se 2,4-D e PIC (25; 50; 75; 100; 125; 150; 175; 200; 225; 250; 275; 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$), com 12 repetições, com quatro explantes por repetição. Transferiu-se os tratamentos com 2,4-D (125, 150, 175 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e PIC (250, 275, 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$) da fase de indução, para a maturação: T1. 2iP (12,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$), ANA (0,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$); T2. T1 + PVP (1 g L^{-1}); T3. T1 + CA (0,3 g L^{-1}) e T4. T1 + CA (3 g L^{-1}). Transferiu-se os embriões somáticos maturados para o meio de germinação, MS (4,43 g L^{-1}), mio-inositol (100 mg L^{-1}), sacarose (30 g L^{-1}), ágar (5,5 g L^{-1}), GA₃ (0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$), BAP (1 $\mu\text{mol L}^{-1}$), PVP (1 g L^{-1}), com quatro repetições, e quatro embriões por repetição. Na fase de indução o número total de embriões (NTE), foi de 44,33 com 2,4-D (175 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e 76,33 com PIC (300 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Por meio de análises morfoanatômicas verificou-se, próembriões, clusters embriogênicos, e embriões somáticos. Observou-se células meristemáticas e embriogênicas, caracterizadas

pela acentuada coloração do citoplasma, formato esférico em intensa divisão celular. Na maturação PIC ($300 \mu\text{mol L}^{-1}$) e PVP (1 g L^{-1}) alcançaram média de 16,67 embriões somáticos maturados e em 2,4-D ($150 \mu\text{mol L}^{-1}$) e PVP (1 g L^{-1}), 13,68. Na indução o 2,4-D ($175 \mu\text{mol L}^{-1}$) e PIC ($300 \mu\text{mol L}^{-1}$) foram eficientes na formação de embriões. Na maturação os meios com 2,4-D ($150 \mu\text{mol L}^{-1}$) e PIC ($300 \mu\text{mol L}^{-1}$) com os fitorreguladores 2iP ($12,3 \mu\text{mol L}^{-1}$) e ANA ($0,6 \mu\text{mol L}^{-1}$) associado à CA ($0,3 \text{ g L}^{-1}$), foram mais eficientes. Na germinação o meio contendo BAP ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$) e GA₃ ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$), promoveram a protrusão de raiz primária e emergência da parte aérea dos embriões. Sugere-se o PIC ($300 \mu\text{mol L}^{-1}$) na indução embriogênica, bem como a utilização de calos dessa concentração, na maturação, em meio com 2iP e ANA associado à CA. O meio contendo BAP e GA₃ sem pulso de auxina apresenta vantagens na germinação de embriões somáticos de *E. edulis*.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Luciano Bestete; D. Sc.; State University of North Fluminense Darcy Ribeiro; october 2021; Auxinic herbicides in the somatic embryogenesis of *Euterpe edulis* Martius - symbol species of the Atlantic Forest; Advisor: D. Sc. Virginia Silva Carvalho; Co-advisor: D. Sc. Rodrigo Sobreira Alexandre.

The *Euterpe edulis* palm has only primary meristematic growth and does not form tillers, preventing vegetative propagation by conventional methods, making *in vitro* propagation, especially somatic embryogenesis, one of the alternatives to the species. In this context, the objective was to analyze the 2.4-D and picloram (PIC) regulators in the induction phase and its residual effect in the other phases of ES of *E. edulis*. In the induction phase, 2.4-D and PIC (25; 50; 75; 100; 125; 150; 175; 200; 225; 250; 275; 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$) were used, with 12 repetitions, with four explants per repetition. Treatments with 2.4-D (125, 150, 175 $\mu\text{mol L}^{-1}$) and PIC (250, 275, 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$) were transferred from the induction phase to maturation: T1. 2iP (12.3 $\mu\text{mol L}^{-1}$), NAA (0.6 $\mu\text{mol L}^{-1}$); T2. T1 + PVP (1 g L^{-1}); T3. T1 + AC (0.3 g L^{-1}) and T4. T1 + AC (3 g L^{-1}). Matured somatic embryos were transferred to germination medium, MS (4.43 g L^{-1}), myo-inositol (100 mg L^{-1}), sucrose (30 g L^{-1}), agar (5.5 g L^{-1}), GA₃ (0.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$), BAP (1 $\mu\text{mol L}^{-1}$), PVP (1 g L^{-1}), with four repetitions, and four embryos per repetition. In the induction phase, the total number of embryos (TNE) was 44.33 with 2.4-D (175 $\mu\text{mol L}^{-1}$) and 76.33 with PIC (300 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Through morphoanatomical analysis, proembryos, embryogenic clusters, and somatic embryos were verified. Embryogenic and meristematic cells

were observed, characterized by marked staining of the cytoplasm, spherical shape in intense cell division. In the PIC ($300 \mu\text{mol L}^{-1}$) and PVP (1 g L^{-1}) maturation they reached an average of 16.67 matured somatic embryos and in 2.4-D ($150 \mu\text{mol L}^{-1}$) and PVP (1 g L^{-1}), 13.68. In induction, 2.4-D ($175 \mu\text{mol L}^{-1}$) and PIC ($300 \mu\text{mol L}^{-1}$) were efficient in the formation of embryos. At maturation, the average with 2.4-D ($150 \mu\text{mol L}^{-1}$) and PIC ($300 \mu\text{mol L}^{-1}$) with 2iP ($12.3 \mu\text{mol L}^{-1}$) and NAA ($0.6 \mu\text{mol L}^{-1}$) regulators associated with AC (0.3 g L^{-1}), were more efficient. During germination, the medium containing BAP ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$) and GA₃ ($0.5 \mu\text{mol L}^{-1}$) promoted primary root protrusion and emergence of the shoot of the embryos. PIC ($300 \mu\text{mol L}^{-1}$) is suggested in embryogenic induction, as well as the use of calluses from this concentration, at maturation, in a medium with 2iP and NAA associated with AC. The medium containing BAP and GA₃ without auxin pulse has advantages in the germination of *E. edulis* somatic embryos.

1. INTRODUÇÃO

Entre as 250 espécies de palmeiras relatadas no Brasil, uma bastante conhecida e apreciada é a *Euterpe edulis* Martius, comumente denominada de juçara, produtora do palmito doce (Lima et al., 2012). É uma espécie símbolo da Floresta Atlântica, tanto pela sua importância ecológica quanto pelo seu valor cultural e interesse econômico (Guimarães e Souza, 2017). Encontra-se ameaçada de extinção devido a exploração predatória para extração e comercialização de palmito, um produto de alto valor econômico (Teixeira et al., 2008; Lima et al., 2012; Lopes et al., 2015; Guimarães e Souza, 2017; MMA, 2017).

O processo de extração do palmito acarreta na morte da planta, por apresentar uma única estirpe, que não perfilha (MMA, 2017). Estimular o manejo dos frutos, como alimento funcional ao invés do palmito, tem sido uma estratégia aplicada com o intuito de reduzir a pressão sobre a espécie, visto que a palmeira fornece fruto com uma polpa muito similar ao açaí da Amazônia (Costa et al., 2008; Marçal et al., 2015).

A formação de uma nova planta ocorre única e exclusivamente por sementes, tendo como agravante um baixo percentual de germinação e o crescimento lento das mudas (de oito a doze anos para alcançar o tamanho comercial) (Dorneles et al., 2013; Moreira et al., 2016). Como os plantios são de mudas seminíferas, a variabilidade genética é alta, o que é um fator indesejável para a produção em escala comercial. Para a exploração comercial de palmeiras,

devem ser desenvolvidas metodologias para a seleção de plantas matrizes e sua propagação vegetativa em larga escala (Pinhal et al., 2011).

Os genótipos elite, podem ser selecionados diretamente entre plantas de populações naturais. No entanto, as espécies de palmeiras não possuem um câmbio vascular, tecido meristemático responsável pela formação de xilema e floema secundários, o que impossibilita um crescimento secundário, impossibilitando procedimentos de clonagem por propagação vegetativa. A embriogênese somática pode, portanto, ser uma alternativa eficiente de propagar palmeiras (Moura et al., 2008).

A propagação vegetativa *in vitro* constitui-se em uma ferramenta de grande importância para plantas com dificuldade de serem multiplicadas vegetativamente, como é o caso das palmeiras e, a exemplo da palmeira *E. edulis*. Dentre os diferentes métodos, a embriogênese somática (ES), tem sido considerada uma técnica promissora e eficiente em várias espécies de palmeiras (Ree e Guerra, 2015). No entanto, a propagação *in vitro* de palmeiras em volume comercial é rara, tornando-se essencial a realização de pesquisas envolvendo a ES, de modo a obter clones em escala comercial. A ES apresenta vantagens sobre as demais técnicas *in vitro*, como a capacidade de produzir grande número de embriões num espaço limitado e o desenvolvimento direto de plantas a partir de embriões individualizados (Guerra et al., 1999).

De modo geral, a ES em palmeiras, tem-se baseado na exposição de células ou tecidos provenientes de diferentes explantes como, embriões zigóticos, inflorescências, ápices caulinares, bainhas foliares, às condições controladas *in vitro* que incluem, além dos fatores ambientais, concentrações de sais minerais, compostos orgânicos (Fehér et al., 2003; Zavattieri et al., 2010) e, principalmente, fitorreguladores, como auxinas e citocininas (Jiménez, 2005; Elhiti et al., 2013).

Para uma melhor compreensão dos eventos que ocorrem no âmbito tecidual e celular em espécies vegetais cultivadas *in vitro* é necessário o emprego de técnicas de análise morfoanatômica que permitam a visualização e comprovação desses eventos celulares (Campos et al., 2020). O estudo do desenvolvimento de células ou grupos de células por técnicas morfoantômicas tem se mostrado muito útil para o entendimento da embriogênese em várias espécies de palmeiras, como *E. edulis* (Guerra; Handro, 1998), *Cocos nucifera* L. (Chan et al., 1998), *Phoenix dactylifera* L. (Sané et al., 2006), *Acrocomia aculeata*

Jack. (Moura et al., 2010), *Euterpe oleracea* Martius (Freitas et al., 2016), *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc. (Silva-Cardoso et al., 2019) e *Butia odorata* (Barb.Rodr.) (Campos et al., 2020).

Os herbicidas auxínicos, também conhecidos por fitorreguladores, auxinas sintéticas ou herbicidas hormonais, apresentam ação semelhante à auxina natural das plantas (ácido indolacético-AIA), podendo induzir às mudanças metabólicas e bioquímicas no metabolismo de ácidos nucleicos e na plasticidade da parede celular e intensa proliferação celular em tecidos (Oliveira Jr. et al., 2011). De maneira geral, o 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenóxiacético) e picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico), são amplamente empregadas na ES para a maioria das espécies de palmeiras (Guerra; Handro, 1988; Steinmacher et al., 2007abc; Scherwinski-Pereira et al., 2012; Freitas et al., 2016; Silva-Cardoso et al., 2019; Meira et al., 2020; Campos et al., 2020).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a eficiência dos fitorreguladores 2,4-D e picloram na fase de indução e seu efeito residual nas demais fases da ES, a partir de embriões zigóticos de frutos imaturos de *E. edulis*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Definir as concentrações dos herbicidas auxínicos 2,4-D e picloram, que propicie a ES de *E. edulis*.

Verificar a combinação dos fitorreguladores 2-iP e ANA, associados aos antioxidantes PVP, CA, ou sem a presença de antioxidantes, na maturação de embriões somáticos de *E. edulis*.

Verificar a combinação dos fitorreguladores BAP e GA₃, associados à pulsos auxínicos com ANA e AIB, ou sem pulso auxínico, na germinação de embriões somáticos de *E. edulis*.

Identificar a responsividade do explante embrião zigótico, de forma a possibilitar a ES de *E. edulis*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Euterpe edulis*

Euterpe edulis Martius é uma palmeira da família Arecaceae, conhecida popularmente como palmitreiro, juçara, içara, ripa, entre outros. Botanicamente pertence à subfamília Arecoideae, tribo Areceae e subtribo Euterpeinae (APG II, 2003).

Endêmica da Floresta Atlântica, esta espécie apresenta ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde a Bahia, com localização mais expressiva na Floresta ombrófila densa da encosta Atlântica e na Floresta estacional semidecidual da Bacia do Rio Paraná. Tem no Rio Grande do Sul seu limite Sul de ocorrência (Henderson, 2000; Nodari et al., 2000; Reis; Kageyama, 2000). É caracterizada como espécie climácica e com estratégia de regeneração do tipo banco de plântulas, com distribuição espacial agrupado próximo das plantas parentais (Fantini et al., 2000).

A espécie *E. edulis*, possui caule único (estirpe), na maioria dos casos alcançando até 20 metros no interior da floresta. Possui folhas alternas, pinadas e bainhas verdes e desenvolvidas formando um coroamento característico na extremidade do caule, onde se encontra o palmito (Reitz et al., 1988). A raque contém muitas ráquias onde se localizam as flores em tríade: uma feminina no centro e duas masculinas, sendo que as flores masculinas são maiores que as femininas (Reitz et al., 1988).

Em relação à fecundação, a espécie *E. edulis* é considerada auto incompatível, com reprodução alógama e polinização entomófila (Dorneles et al., 2013). A polinização por ação do vento, ou anemofilia, também desenvolve papel relevante para a polinização da espécie (Reis et al., 1993). Os cachos de frutos têm em média 3 kg com milhares de frutos que pesam em média 1 g, com cerca de 1 a 1,5 cm de tamanho (Henderson, 2000). O fruto da palmeira *E. edulis*, é muito semelhante ao fruto do açaí (*Euterpe oleracea* Martius). Estes são drupas esféricas, de cor violáceo-escura quando maduros, com polpa escassa e endocarpo lenhoso, que envolve completamente a semente (Carvalho, 2003).

O período de floração ocorre de setembro a dezembro e de frutificação entre maio e dezembro (Lorenzi et al., 2010), variando entre locais. O amadurecimento dos frutos no cacho não ocorre de forma homogênea e a coloração evolui de verde a preto. Cerca de 85% do fruto corresponde a semente, sendo a polpa muito fina (Schulz et al., 2016). A espécie tem grande importância ecológica, por ser um recurso alimentar valioso. Cada indivíduo pode produzir cerca de três cachos por ano, sendo uma espécie chave para a Mata Atlântica contribuindo para a sobrevivência de inúmeras espécies de aves e roedores que se alimentam de seus frutos, flores, sementes e folhas (Carvalho et al., 2016; Silva et al., 2017).

A palmeira *E. edulis* é uma espécie vegetal bastante estudada, sendo um dos alvos para as pesquisas, manutenção da espécie e tecnologias de manejo. A espécie tem uma alta importância econômica, pois é produtora de um dos principais produtos florestais não madeireiros (PFNMs) obtidos da Floresta Atlântica, o palmito (Fantini et al., 2004). Além do palmito a espécie pode fornecer diversos produtos: a estirpe madura para caibros e ripas para construção; as folhas são usadas para coberturas temporárias e forrageio; frutos fornecem um extrato que gera um semelhante ao do açaí (*E. oleracea*) (Pio Corrêa, 1969). É apontada como uma excelente opção, tanto para garantir uma renda alternativa aos proprietários de terras, como para a recuperação de florestas secundárias e degradadas devido ao corte seletivo (Ihering, 1968; Sick, 1984).

Em condições naturais, a espécie *E. edulis* é bastante expressiva na comunidade adulta nas áreas cobertas por Floresta Atlântica (Scudeller et al., 2001). No entanto enfrenta continuamente riscos elevados de extinção na natureza, devido à exploração predatória na extração do palmito (MMA, 2017). O

processo de extração do palmito acarreta na morte da planta, por apresentar uma única estirpe. É classificada como vulnerável no Livro Vermelho da Flora do Brasil (Leitman et al., 2013).

A palmeira *E. edulis* tem-se destacado pela potencialidade de manejo sustentável, não mais com enfoque na produção de palmito, mas nos frutos, para obtenção de polpas. Diversos estudos vêm indicando o alto conteúdo polifenólico e atividade antioxidante da polpa de frutos de juçara, sendo por conta disso considerado um alimento funcional, que combate radicais livres (Silva et al., 2006; Menezes et al., 2008; Lima et al., 2012).

A formação de uma nova planta ocorre na prática única e exclusivamente por meio de sementes. Este método de propagação seminífero apresenta como desvantagem plantas com alta variabilidade genética, pela necessidade de fecundação cruzada, em virtude da espécie ser auto incompatível (Dorneles et al., 2013), a de ser recalcitrante com redução no teor da umidade resultando na perda da viabilidade das sementes e, conseqüentemente, reduzindo a germinação, a qual é lenta e desuniforme, o que é considerado como um problema prático para o estabelecimento de plantios dessa cultura (Bovi; Cardoso, 1975).

Outro agravante, quanto à propagação é que esta espécie não possui câmbio vascular, entre o lenho e líber que produz células novas, impedindo a emissão de brotações laterais e perfilhamentos, impossibilitando a propagação vegetativa como por meios de estaquia e enxertia (Moura et al., 2008).

Desta forma, verifica-se a necessidade do emprego de técnicas de propagação para após seleção para fixar as características desejáveis. É necessário, portanto, a seleção de indivíduos altamente produtivos, com qualidade física do fruto, química da polpa e vigorosos (Panza et al., 2007). Nesse contexto, o emprego de técnicas baseadas na propagação *in vitro* torna-se uma das únicas alternativas para a propagação vegetativa, seja para subsidiar estratégias de conservação, auxiliar programas de melhoramento genético, ou ainda, potencializar a propagação da espécie (Silva-Cardoso et al., 2019).

3.2 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA *IN VITRO*

A propagação vegetativa *in vitro* ou micropropagação é uma técnica para multiplicar plantas sob adequadas condições de assepsia, nutrição (inorgânicas

e/ou orgânicas) e fatores ambientais como luz, temperatura, oxigênio, gás carbônico. Trata-se de uma propagação assexuada de plantas a partir de técnicas de cultura de tecidos vegetais (Carvalho et al., 2011).

A propagação vegetativa *in vitro* visa à obtenção de grande quantidade de plantas idênticas à matriz em relativo curto período, num espaço reduzido e livre de contaminantes. Para a realização desta técnica, a escolha da planta matriz, da qual se retiram os explantes destinados a se propagar, é uma etapa de fundamental importância. É interessante que sejam escolhidas boas matrizes, pois as demais plantas obtidas *in vitro* serão idênticas a planta-mãe (Grattapaglia; Machado, 1998).

O estabelecimento e a multiplicação de uma determinada espécie vegetal *in vitro* depende da combinação adequada de variáveis que, sujeita à influência de diversos fatores, proporciona o sucesso da propagação para cada espécie. As concentrações dos sais e dos fitorreguladores nos meios de cultura são os fatores que mais variam entre as técnicas utilizadas para a propagação *in vitro*. Outras variáveis como a utilização de agentes geleificantes nos meios de cultura, o tamanho dos frascos e os tipos de tampa empregadas no fechamento dos recipientes, pode influenciar o desenvolvimento das plantas (Souza et al., 1999).

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de tecidos vegetais fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos explantes e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. Baseiam-se nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender às necessidades específicas nas condições de cultivo *in vitro* (Caldas et al., 1998; Torres et al., 2001).

A regeneração de plantas *in vitro* pode ocorrer por organogênese ou embriogênese somática. A organogênese pode ser definida como o processo em que as células e os tecidos são induzidos a sofrer mudanças que levam à formação de uma estrutura unipolar, podendo ser um primórdio caulinar ou radicular, cujo sistema vascular se encontra conectado ao explante original. Diferentemente, a embriogênese somática leva à produção de uma estrutura bipolar, contendo ápice caulinar e radicular, com um sistema vascular independente (Thorpe, 1994).

A ES é o meio pelo qual as células somáticas se desenvolvem em estruturas que se assemelham a embriões zigóticos (isto é, bipolar e sem

conexão vascular ao tecido parental) com uma série de estádios embriogênicos característicos, sem fusão de gametas (Jiménez, 2001). A organogênese e a ES vêm sendo estudadas para várias espécies de interesse econômico, incluindo arbóreas e nativas ameaçadas de extinção (Santa-Catarina et al., 2001; Peña-Ramírez et al., 2010; Aragão et al., 2011; Pelegrini et al., 2013; Aragão et al., 2016).

A regeneração de plantas *in vitro* pode ocorrer por duas vias, direta ou indiretamente. A organogênese direta refere-se ao surgimento direto de gemas a partir de tecidos que apresentam potencial morfogênético na planta *in vivo*, mas que em geral não se expressam. A fase da organogênese indireta ocorre quando o processo de regeneração *in vitro* dos explantes é precedido pela formação de calo (Grattapaglia; Machado, 1998). Na embriogênese direta, o embrião somático se origina diretamente do explante e na indireta, se desenvolve das células do calo, depois de um período mais ou menos longo de proliferação. O embrião se forma a partir de células embriogênicas, as quais se distinguem das outras células do calo devido ao aspecto similar às células meristemáticas (Guerra et al., 1999).

Teoricamente, a ES se destaca como uma boa opção para a propagação vegetativa *in vitro*, em virtude de apresentar algumas vantagens. Dentre elas, alta taxa de multiplicação, escalonamento da produção pela manutenção da cultura em meio líquido, plantio direto da muda obtida via ES, característica genética igual à planta-mãe. Além da possibilidade de transferência de genes, razão pela qual tem sido utilizada como ferramenta em estudos de desenvolvimento de plantas, propagação clonal e melhoramento genético (Carvalho et al., 2006). Porém, apresenta a desvantagem da ocorrência de variação somaclonal quando o objetivo é propagação clonal e não a obtenção de variabilidade genética (Fehér, 2003).

Diversos estudos têm sido realizados na área da propagação *in vitro*, principalmente com relação à ES em palmeiras. As principais espécies de interesse comercial são: *C. nucifera*, (Verdeil et al., 1994); *Elaeis guineenses* Jacq (Teixeira et al., 1993; Balzon et al., 2013); *P. dactylifera* (Fki et al., 2003; Sané, 2006; Othmani et al., 2009); *E. edulis* (Guerra; Handro, 1988, Guerra; Handro, 1998); *E. oleracea* (Scherwinski-Pereira et al., 2012; Freitas et al., 2016); *A. aculeata* (Moura et al., 2009, Meira et al., 2020); *Bactris gasipaes* Kunth.

(Steinmacher et al., 2007abc; Heringer et al., 2014), *S. oleracea* (Silva-Cardoso et al., 2019) e *B. odorata* (Campos et al., 2020).

Os primeiros relatos sobre ES em *E. edulis* no Brasil foram descritos por Guerra e Handro (1988), apresentando em seus estudos a possibilidade do uso de embriões zigóticos e inflorescências jovens como fonte de explantes para a obtenção de um protocolo de ES para esta espécie. Posteriormente, Saldanha et al. (2007) e Saldanha e Martins-Corder (2012), também utilizaram em protocolos de ES em *E. edulis*, bainhas foliares de plântulas jovens e embriões zigóticos de frutos imaturos, como fonte de explantes.

3.3 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

A teoria de que todas as células somáticas, em uma determinada planta, contêm toda a informação genética necessária para a geração de uma nova planta foi afirmada por Haberlandt, em 1902. O desenvolvimento de embriões somáticos foi originalmente obtido a partir de experimentos realizados em cenoura (*Dacus carota*) por Steward e Reinert em 1958. Desde então a técnica tem sido utilizada em várias espécies de plantas (Vasil, 2008).

Nas últimas décadas a ES foi desenvolvida com o intuito de propiciar uma rápida multiplicação de inúmeras espécies, e, passou a ser utilizada não somente como uma técnica de pesquisa, mas com o interesse industrial. Destarte, a ES figura como uma das técnicas de maior interesse na cultura de tecidos vegetais e pode ser entendida como um conjunto de etapas pelas quais células somáticas diferenciam-se em embriões (Pinto et. al., 2011).

A ES possui várias aplicações, como a utilização como modelo em estudos de desenvolvimento embriogênico, formação de bancos de germoplasma por meio da criopreservação, e propagação clonal em larga escala, além de ser utilizada para transformação genética (Von Arnold et al., 2002). Este processo é ideal para investigar o mecanismo de diferenciação em plantas, bem como a expressão da totipotência da célula vegetal. Incluem-se abordagens diferenciais da competência celular que é definida como o potencial de reprogramação de uma célula em resposta a sinais específicos, por meio de processos de desdiferenciação e rediferenciação (Féher et al., 2003).

A indução da ES é uma etapa crucial para o estabelecimento de culturas

embriogênicas *in vitro*. O processo da indução depende da interação combinada de fatores internos (genótipo, idade, tipo de explante, condições fisiológicas) e fatores externos (composição do meio de cultura, fitorreguladores, luz, temperatura) (Pinto et al., 2008). A iniciação da técnica da ES, de modo geral, tem-se baseado na exposição de células ou tecidos provenientes de diferentes explantes (embriões zigóticos, inflorescências, ápices caulinares, folhas imaturas e outros (Fehér, 2015).

O estágio de desenvolvimento dos embriões zigóticos utilizados como fonte de explante é fundamental para a expressão de seu potencial morfogênético e para o estabelecimento de culturas embriogênicas. Fatores relacionados à condição fisiológica do explante, às características da espécie e condições experimentais, como a composição do meio de cultura e a atmosfera no interior dos frascos durante o cultivo podem ser fundamentais para o estabelecimento da competência e recepção dos sinais para desencadear o processo de diferenciação celular (Chalupa, 1999).

A ES apresenta dois padrões básicos de desenvolvimento de embriões: direta, na qual os embriões somáticos originam-se diretamente sem a formação de estádios intermediários de calos; e indireta, na qual os embriões somáticos se formam a partir de calos, que apresentam células em diferentes estádios de diferenciação (Sharp et al., 1980). Em ambos os padrões, o embrião somático segue a mesma sequência de desenvolvimento do embrião zigótico, ou seja, a passagem pelos estádios globular, cordiforme, escutelar e cotiledonar, em Magnoliopsidas (Guerra et al., 1999). Entretanto, no caso do desenvolvimento embrionário de Liliopsidas, o embrião na fase cordiforme possui uma forma cilíndrica (Floh et al., 2015).

Os fitorreguladores tais como as auxinas e as citocininas adicionadas ao meio de cultura são considerados fatores fundamentais para a ES regulando o ciclo celular e promovendo a expressão desta rota morfogênética. As auxinas mais usadas são AIA (ácido indol-3-acético), AIB (ácido indol-3-butírico), ANA (ácido α -naftalenoacético), 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenóxiacético), 2,4,5-T (ácido 2,4,5-triclorofenóxiacético), 4-CPA (ácido 4-clorofenóxiacético) e picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico) (Francis; Sorrell, 2001; Jiménez, 2005).

A ES requer geralmente que os meios de cultura de indução sejam constituídos por altas concentrações de auxinas, como o 2,4-D ou picloram

(Guerra; Handro, 1998; Pérez-Núñez et al., 2006; Sáenz et al., 2006; Scherwinski-Pereira et al., 2012). Essa classe de fitorreguladores está envolvida na ativação e regulação da divisão e diferenciação celular (Namasivayam, 2007).

Protocolos de ES já foram descritos para algumas espécies de palmeiras, como a *P. dactylifera* (Sharma et al., 1984; Fki et al., 2003; Sané et al., 2006; Othmani et al., 2009), *E. guineensis* (Ahée et al., 1981; Teixeira et al., 1993; Scherwinski-Pereira et al., 2010; Balzon et al., 2013), *A. aculeata* (Moura et al., 2008), *E. oleracea* (Scherwinski-Pereira et al., 2012), *B. gasipaes* (Steinmacher et al., 2007abc; Heringer et al., 2014) e *E. edulis* (Guerra; Handro, 1988).

3.4 HERBICIDAS AUXÍNICOS: 2,4-D E PICLORAM NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE *Euterpe edulis*

Os hormônios vegetais são mensageiros químicos, produzidos em uma célula, que modulam os processos celulares em outra célula, interagindo com proteínas específicas que funcionam como receptores ligados a rotas de transdução de sinal, cuja finalidade é induzir respostas fisiológicas, tais como indução de raízes, indução de brotos, alongamento de entrenós, etc. (Guerra; Nodari, 2006; Cid, 2010).

Em outras palavras os fitormônios, como também são chamados os hormônios vegetais, são substâncias endógenas que exercem sua ação por meio do reconhecimento de receptores específicos presentes em células responsivas, traduzindo sinais hormonais em eventos bioquímicos e fisiológicos (Guerra et al., 1999). Outras funções relacionadas com os hormônios vegetais são a regulação da intensidade e da orientação do crescimento, da atividade metabólica, do transporte, estoque e mobilização de materiais nutritivos (Larcher, 2006).

Os principais hormônios vegetais são as auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e ácido abscísico. Estes, por sua vez, desempenham diversas funções tais como: o estímulo ao crescimento da planta, à floração, à formação e ao amadurecimento dos frutos, à formação dos tecidos vegetais. Promovem a adaptação da planta às condições de falta de água (estresse hídrico) e estimulam a germinação e a quebra (ou indução) da dormência (Raven, 2007; Taiz; Zeiger, 2017).

Existem algumas diferenças e conceitos sobre hormônios vegetal, fitorreguladores e estimulante de crescimento vegetal. Os hormônios vegetais, produzidos pela própria planta, ou fitormônios, são substâncias orgânicas que desempenham funções que regulam a diferenciação, a morfogênese e todo o desenvolvimento vegetal (Raven et al., 2007). Os fitorreguladores são substâncias utilizadas de forma sintética ou natural que quando aplicadas nas plantas possuem ações similares aos compostos vegetais conhecidos. Os retardadores vegetais são compostos sintéticos, que retardam a alongação e a divisão celular no meristema subapical. E finalmente, os estimulantes vegetais se referem à mistura de fitorreguladores vegetais, ou de um ou mais reguladores com compostos de natureza bioquímica diferente (aminoácidos, vitaminas) (Castro; Vieira, 2001).

O uso de fitorreguladores adquiriu grande importância, pois, com seu emprego, foi possível modificar diversos processos fisiológicos das plantas (Soares, 1999; Lamas, 2001). Skoog e Miller (1957) estabeleceram o princípio do controle hormonal na formação de órgãos em células de medula de tabaco cultivadas *in vitro* e obtiveram a diferenciação de órgãos (gemas e raízes) pela ação quantitativa de auxinas e citocininas. Tal diferenciação é regulada pelas concentrações relativas dos dois tipos de fitorreguladores no meio de cultura, onde os tecidos usualmente requerem um suprimento exógeno de auxinas e citocininas para alcançarem níveis de desenvolvimento adequados (Droual et al., 1980).

A partir da identificação e do conhecimento de suas funções, foram desenvolvidos produtos naturais ou sintéticos para uso na agricultura, sendo inúmeros os estudos que mostram o efeito positivo no uso dessas substâncias. Os fitorreguladores são utilizados na propagação *in vitro*, formação de mudas, controle do crescimento das plantas, indução de floração, dentre outras (Petri et al., 2016).

Tem sido sugerido que as auxinas são necessárias para a formação de agregados embriogênicos a partir de células individuais expressando a totipotência das células competentes (Fehér et al., 2003). Os herbicidas 2,4-D e picloram pertencem ao grupo dos herbicidas auxínicos ou mimetizadores de auxina (Silva et al., 2007; Grossmann, 2010), que são amplamente empregados em protocolos de embriogênese somática para a maioria das espécies de

palmeiras estudadas (Steinmacher et al., 2007abc, Scherwinski-Pereira et al., 2012, Saldanha; Martins-Corder, 2012, Freitas et al., 2016, Granja et al., 2018, Meira et al., 2020).

Em estudos envolvendo herbicidas auxínicos na embriogênese somática, Jiménez (2005), verificou-se uma estimativa de que 49% dos estudos na propagação *in vitro* utilizam 2,4-D e 5% picloram. Atualmente, verifica-se na literatura o avanço no uso destes fitorreguladores na embriogênese somática, principalmente em palmeiras, no entanto para a espécie *E. edulis*, observam-se poucos trabalhos. Tendo em vista os estudos encontrados na literatura até o presente, objetivou-se com este trabalho investigar a ação do 2,4-D e do picloram na indução da ES em *E. edulis*.

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é a auxina sintética mais comumente utilizada para a indução de calos. É também a auxina mais ativa, podendo substituir a auxina natural ácido indolacético (AIA) em meios de cultura, pois esta última é rapidamente oxidada. O 2,4-D é essencial para que se alcance a fase de formação de massas celulares proembriogênicas, bem como a de transição de proembriões do estágio globular para cordiforme. Levam à síntese de novos produtos gênicos ainda não estabelecidos na fase anterior. Aparentemente, a partir da primeira divisão assimétrica que conduz a uma condição polar, a presença de auxinas como o 2,4-D nessa fase é fundamental para mediar um transporte polar e para a síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) (Cid, 2010).

Realizando testes com diferentes concentrações da auxina 2,4-D (0, 10, 30 e 40 mg L⁻¹), na indução da calogênese e na germinação de embriões zigóticos da palmeira *E. edulis*, Gomes et al. (2017) obtiveram maior porcentagem de calogênese em embriões zigóticos em meio de cultivo com 2,4-D (30 mg L⁻¹), e maior germinação (62,5%) em meio com ausência de 2,4-D. Saldanha e Martins-Corder (2012) obtiveram baixa porcentagem de calogênese a partir de embriões zigóticos de frutos imaturos de *E. edulis* em meio suplementado com 2,4-D (40 mg L⁻¹).

Além do 2,4-D, também tem sido relatado em palmeiras o uso de outras auxinas, com diferentes resultados quanto à eficiência, como o ácido 4-amino-3, 5, 6-tricloropicolínico (picloram) (Karun et al., 2004; Steinmacher et al., 2007b; Thuzar et al., 2012; Pádua et al., 2013; Luis; Scherwinski-Pereira, 2014; Padilha

et al., 2015; Bonetti et al., 2016; Mazri et al., 2017); bem como a combinação entre auxinas 2,4-D e picloram (Yusnita; Hapsoro, 2011; Jayanthi et al., 2015).

O picloram é uma auxina sintética derivada do ácido picolínico e atua na modificação da parede celular vegetal de modo direto, na síntese ou degradação de componentes, ou de maneira indireta, induzindo a diferenciação e proliferação celular (Alayón-Luaces et al., 2012). O picloram, por exemplo, tem proporcionado bons resultados na indução da ES em *B. gasipaes* (Valverde et al., 1987; Steinmacher et al., 2007abc), *Calamus merrillii* Becc. e *Calamus subinermis* Becc. (Goh et al., 2001) e *E. oleracea* (Scherwinski-Pereira et al., 2012).

Calos embriogênicos foram obtidos a partir de embriões zigóticos de frutos maduros de pupunha (*B. gasipaes*) em um meio de cultura suplementado com picloram como fonte de auxina. Esta auxina também foi capaz de induzir competência embriogênica em embriões zigóticos de frutos maduros de *E. guineensis* (Teixeira et al., 1995) e foi a fonte de auxina que induziu a maior porcentagem de calos embriogênicos de *Areca catechu* L. (Karun et al., 2004). A formação direta de embriões somáticos em *Paspalum scrobiculatum* L. ocorreu com a utilização de altos níveis de picloram, isoladamente ou em combinação com cinetina (Kaur; Kothari, 2004). O picloram também foi efetivo na obtenção de ES repetitiva em *Arachis hypogaea* L. (Little et al., 2000).

Referindo-se ao gênero *Euterpe*, Freitas et al. (2016) verificaram que a auxina picloram proporcionou melhores resultados na indução de calos embriogênicos, tanto para inflorescências como para as folhas imaturas em açazeiro (*E. oleracea*). Na etapa de diferenciação, calos embriogênicos provenientes de inflorescências imaturas em meio de cultura com picloram apresentaram até 100% dos explantes formando embriões somáticos. Para *E. edulis*, bainhas foliares extraídas de plântulas germinadas *in vitro* foram inoculadas em meio MS, suplementado com picloram (72,3 mg L⁻¹). A formação de calos em bainhas foliares de plântulas jovens de palmitero foi favorecida significativamente pelo picloram (Saldanha et al., 2006).

Poucos estudos são relatados envolvendo o picloram na ES em *E. edulis*. Sendo assim, faz-se necessário mais estudos visando otimizar protocolos de ES desta espécie de grande importância econômica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV), do Departamento de Ciências Florestais e da Madeira (DCFM), pertencente ao Centro de Ciências Agrárias e Engenharias (CCAIE), da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), localizado no município de Jerônimo Monteiro-ES.

4.1 MATERIAL VEGETAL E DESINFESTAÇÃO DOS EXPLANTES

Utilizou-se embriões zigóticos de frutos imaturos (~180 dias pós antese) de *E. edulis* (Figuras 1A, B, C), com epicarpo de coloração verde (Figura 1D) e mesocarpo com consistência macia (Figura 1E), colhidos de planta matriz com qualidade fitossanitária e alta produtividade, situada no distrito de Pedra Menina, nas coordenadas geográficas 20° 32' 44" S e 41° 49' 30" W, localizado no município de Dores do Rio Preto-ES, Brasil. Posteriormente, os frutos foram transportados em caixas térmicas com bolsa de gelo em gel.

Os frutos foram lavados em água corrente com detergente neutro para a remoção de impurezas, em seguida retirou-se as sépalas e cascas dos frutos (Figura 1E), os quais foram mergulhados em ácido ascórbico 2%. Em câmara de fluxo laminar, os frutos descascados foram imersos em álcool 70% por um minuto, seguida de hipoclorito de sódio comercial (NaOCl, 2%) (Candura®, Brasil), durante 10 minutos e amoxicilina (3 g L⁻¹) (Germed®, Brasil) por 10 minutos, sob leve

agitação. No intervalo de cada desinfestação, os frutos foram lavados três vezes com água destilada autoclavada. Terminada a desinfestação, os embriões zigóticos foram extraídos (Figuras 1F e 1G), para a disposição em meio de cultura.

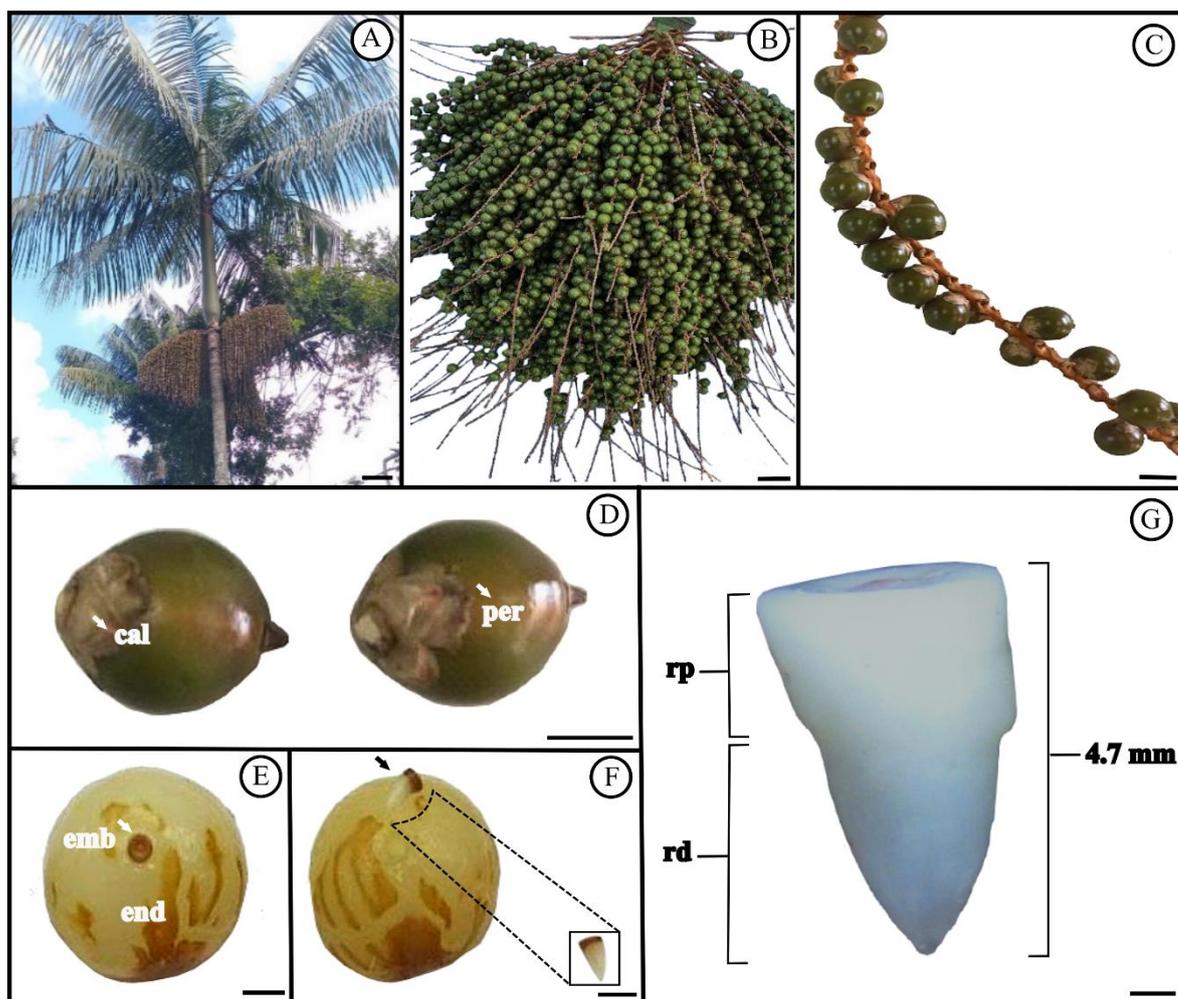


Figura 1. (A) Matriz de *E. edulis*; (B) Cacho de frutos verdes (~180 dias pós antese); (C) Frutos verdes; (D) Detalhes do cálice (cal) e pericarpo (per) removidos no processo de desinfestação; (E) e (F) Endosperma (end) com embrião zigótico (emb) inserido na cavidade (seta branca) e posterior remoção (seta preta); (G) Embrião zigótico em ampliação, com a região distal (rd) inserida no endosperma, que corresponde ao haustório e a região proximal (rp). Barras: 1 mm (C, D, E, F, G), 5 cm (B), 20 cm (A).

4.2 INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

Após a desinfestação, em câmara de fluxo laminar, os embriões zigóticos (explantes) foram destacados com auxílio de pinça e bisturi e inseridos em placas de Petri de poliestireno 90 x 15 mm (Global Trade Technology, Brasil[®]), contendo meio de indução de embriogênese somática (MI) (aproximadamente 20 mL de meio por placa), formado pelo meio MS (Murashige; Skoog, 1962) concentração total de sais (4,4 g L⁻¹) (Sigma[®]), polivinilpirrolidona (PVP) (Synth[®]) (1 g L⁻¹), mio-inositol (100 mg L⁻¹) (Sigma[®]), sacarose (30 g L⁻¹) (Neon[®]), ágar (5,5 g L⁻¹) (Kasvi[®]), pH ajustado para 5,7 ± 0,1 com 1 mol L⁻¹ ou 0,1 mol L⁻¹ de KOH, antes da adição do ágar.

Os indutores utilizados foram 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) e picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico) (ambos Sigma[®]), sendo dois experimentos distintos, nas respectivas concentrações para ambos: 25; 50; 75; 100; 125; 150; 175; 200; 225; 250; 275; 300 µmol L⁻¹, totalizando 12 tratamentos em cada fonte auxínica, com 12 repetições (placas) contendo quatro explantes (embriões zigóticos) por repetição (Tabela 1). O meio de indução preparado foi submetido à esterilização em autoclave a 121 °C por 20 minutos e pressão de 1,5 kgf cm⁻². Após a disposição dos explantes no meio de cultura, as placas de Petri foram vedadas com filme plástico PVC (Goodyear[®], Brasil) e envolvidas com papel alumínio, sendo mantidas em sala de crescimento a 27 ± 1 °C. Os explantes foram mantidos neste meio de cultura por até 180 dias e posteriormente foram transferidos dos tratamentos mais responsivos de indução para o meio de diferenciação e maturação.

Foram avaliadas a calogênese (%), calo embriogênico (%), número total de embriões somáticos (NTE), área média dos calos (mm²) (AMC) e relação do número total de embriões com a área média dos calos (NTE/AMC). A caracterização para calos embriogênicos foi a aparência mucilaginosa e esponjosa com características nodulares, enquanto que para calos não embriogênicos verificou-se calos com aspectos duros, compactos, lisos e aparência vítrea, sem a presença de aglomerados proembriogênicos. Para a variável NTE foi feito a contagem do número de embriões em cada repetição.

4.3 DIFERENCIAÇÃO E MATURAÇÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS

A partir das análises dos resultados obtidos no experimento de indução, foram selecionados os tratamentos de calos embriogênicos induzidos com 2,4-D, nas concentrações de 125, 150 e 175 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e picloram, nas concentrações de 250, 275 e 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$, as quais foram mais representativas para transferência para o experimento em meio de maturação.

Os tratamentos foram realizados em DIC, nas seguintes combinações em meio MS (4,4 g L^{-1}), mio-inositol (100 mg L^{-1}), sacarose (30 g L^{-1}), ágar (5,5 g L^{-1}), suplementado com 12,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de 2iP (isopenteniladenina) (Sigma®), 0,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ANA (ácido naftaleno acético) (Sigma®): T1. MS (ausência de PVP e carvão ativo); T2. MS + PVP (1 g L^{-1}), T3. MS + Carvão ativo (0,3 g L^{-1}) e T4. MS + Carvão ativo (3 g L^{-1}), ambos com quatro repetições (placas) com três calos por repetição (Tabela 1). O 2iP e ANA foram inseridos no meio de cultura por filtração a frio (filtro de 0,22 μm Millipore®).

Todos os meios foram vertidos em placas de Petri estéreis de poliestireno 90 x 15 mm (aproximadamente 20 mL de meio por placa), vedadas com filme plástico PVC, envolvidas com papel alumínio e mantidas em sala de crescimento com 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12 horas e temperatura a 27 ± 1 °C, por 90 dias. Foram avaliadas nesta fase as seguintes variáveis: porcentagem média de antocianina (%ANT), porcentagem média de oxidação (%OXI), porcentagem média de cristalização (%CRI), média da massa dos calos no início da fase de maturação (MCI), média da massa dos calos no final da maturação (MCF), porcentagem média de embriogênese secundária (%ES), número médio de embriões somáticos (NES), número médio de embriões globulares (NEG) e número médio de embriões escutelares (NEE).

4.4 GERMINAÇÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS

Após a diferenciação e maturação, os embriões somáticos provenientes de todos os tratamentos de maturação, 2,4-D (125, 150, 175 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e picloram (250, 275, 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$), foram transferidos para o meio de regeneração. Os tratamentos foram realizados em DIC. O meio utilizado foi o MS (Murashige; Skoog, 1962) concentração total de sais (4,4 g L^{-1}), mio-inositol (100,0 mg L^{-1}),

sacarose (30,0 g L⁻¹), ágar (5,5 g L⁻¹), ácido giberélico-GA₃ (0,5 µmol L⁻¹) (Sigma®), N6-benzilaminopurina-BAP (1,0 µmol L⁻¹) (Sigma®), polivinilpirrolidona-PVP (1,0 g L⁻¹) (Tabela 1), com quatro repetições (placas de poliestireno 90 x 15 m com aproximadamente 20 mL de meio por placa) com quatro embriões por repetição. Após 60 dias o experimento foi repetido, renovando-se o meio de germinação com os mesmos componentes e concentrações supracitadas. Visando à protrusão de raiz primária, utilizou-se os fitorreguladores, ácido naftalenoacético (ANA) e ácido indolbutírico (AIB) (ambos Sigma®), constituindo-se três tratamentos: T1. meio de germinação sem pulso auxínico (controle), T2. T1 + com pulso de ANA (2000 mg L⁻¹) e T3. T1 + com pulso de AIB (2000 mg L⁻¹). Os embriões, antes de serem transferidos para o novo meio, foram mergulhados em ANA (T2) e AIB (T3), por 10 segundos para dar um pulso na germinação, a qual pode ser observada 30 dias após este processo.

O GA₃ foi transferido para o meio de cultura por filtragem a frio (filtro de 0,22 µm Millipore®) após a autoclavagem do meio de cultura, enquanto o BAP foi autoclavado. Os calos foram transferidos para placas de Petri estéreis de poliestireno 90 x 15 m (aproximadamente 20 mL de meio por placa) de meio de cultura de germinação, onde permaneceram até que os embriões somáticos apresentassem protrusão de raiz primária suficiente para serem individualizados, (aproximadamente 90 dias).

Nesta fase, os cultivos foram colocados em condições de luminosidade de 30 µmol m⁻² s⁻¹, com característica de luz branca de similaridade espectral entre as bandas, fotoperíodo de 12 horas em sala de crescimento e temperatura a 27 ± 1 °C. Foi avaliada a porcentagem de embriões com protrusão de raiz. Nas etapas anteriores, de indução da embriogênese somática, de diferenciação e maturação dos embriões somáticos, os cultivos foram mantidos sob condições de escuro.

Tabela 1. Composição básica dos meios de cultura utilizados nos diferentes estádios da ES em *E. edulis*

Componentes Meios de Cultura	Indução	Maturação	Germinação
MS (g L ⁻¹)	4,4	4,4	4,4
Picloram (µmol L ⁻¹)	25; 50; 75; 100;125;150; 175; 200; 225; 250; 275 e 300	-	-
2,4-D (µmol L ⁻¹)	25; 50; 75; 100;125;150; 175; 200; 225; 250; 275 e 300	-	-
ANA (µmol L ⁻¹)	-	0,6	-
2iP (µmol L ⁻¹)	-	12,3	-
BAP (µmol L ⁻¹)	-	-	1
GA ₃ (µmol L ⁻¹)	-	-	0,5
Mio-inositol (g L ⁻¹)	0,1	0,1	0,1
Sacarose (g L ⁻¹)	30	30	30
Ágar (g L ⁻¹)	5,5	5,5	5,5
Polivinilpirrolidona (g L ⁻¹)	1	0 e 1	1
Carvão ativado (g L ⁻¹)	-	0,3 e 3	-

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A fase de indução foi realizada em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), constituído de dois fitorreguladores, sendo dois experimentos separados. Os indutores utilizados foram 2,4-D e picloram, nas respectivas concentrações para ambos: 25; 50; 75; 100; 125; 150; 175; 200; 225; 250; 275; 300 µmol L⁻¹, totalizando 12 tratamentos para cada indutor auxínico, em dois experimentos distintos, com 12 repetições (placas) contendo quatro explantes (embriões zigóticos) por repetição. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), pelo teste F e análise de regressão, com o auxílio do Programa Genes (Cruz, 2016).

A fase de maturação foi realizada em DIC, por meio de calos provenientes dos melhores tratamentos de indução com 2,4-D (125, 150, 175 µmol L⁻¹) e picloram (250, 275, 300 µmol L⁻¹), nas seguintes combinações de meios de maturação; (T1. MS; T2. PVP 1 g L⁻¹; T3. CA 0,3 g L⁻¹; T4. CA 3 g L⁻¹) ambos com quatro repetições (placas), com três calos por repetição. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), pelo teste F e as médias comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade, com o auxílio do

Programa Genes (Cruz, 2016).

A fase de germinação foi realizada em DIC, provenientes dos embriões somáticos dos tratamentos de maturação, com quatro repetições (placas) com quatro embriões por repetição. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), pelo teste F e as médias comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade, com o auxílio do Programa Genes (Cruz, 2016).

4.6 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA MICROSCOPIA

Para a caracterização morfológica, anatômica e ultraestrutural do processo de ES, foram coletados calos representativos dos tratamentos de indução. As amostras foram compostas de tratamentos cujas respostas embriogênicas foram satisfatórias. A fixação foi feita em solução Karnovsky (Karnovsky, 1965).

4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA: MEV

Amostras de calos formados na fase de indução foram separados para análise com microscopia eletrônica de varredura. Para tanto, as amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2% e tampão cacodilato 0,1 mol L⁻¹), por 24 h. Em seguida foram lavadas cinco vezes em tampão de cacodilato de sódio a 0,05 mol L⁻¹, pH ajustado para 7,1. As amostras fixadas foram desidratadas em série alcoólica com etanol por 10 minutos a 20, 30, 50, 70, 80, 90% e três passagens em álcool 100%.

Ao final da desidratação as amostras foram levadas à secagem em ponto crítico com CO₂ (Autosamdri 815, Tousimis®), colocadas em “stubs”, aderidas com fita de carbono dupla face e submetidas à deposição metálica com ouro, pelo processo de pulverização catódica (Desk V, Denton Vacuum®). As análises e fotodocumentação foram conduzidas utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura (JSM - 6610LV, Jeol®) e todas as imagens foram digitalmente processadas. As análises foram feitas no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins, da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

4.8 ANÁLISES HISTOLÓGICAS E ESTRUTURAIS

Para a análise anatômica foram coletadas amostras de explantes de diferentes formações calogênicas e de embriões em diferentes estádios de desenvolvimento. As etapas de fixação, desidratação e emblocamento do material vegetal foram realizadas conforme o seguinte protocolo: fixação em solução de Karnovsky modificada (Karnovsky, 1965), composta por paraformaldeído 4%, glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,2), por um período de 24 horas (sob vácuo durante a primeira hora), seguida de três lavagens em solução de cacodilato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2), por um período de 1 hora cada (sob vácuo); logo após, desidratação em série alcoólica crescente (30, 50, 70, 80, 90 e 100%), por uma hora cada (sob vácuo) e infiltração em historesina (Leica, Heidelberg, Alemanha), segundo as especificações do fabricante.

Posteriormente, os cortes transversais e longitudinais (espessura de $5 \mu\text{m}$) foram obtidos com um micrótomo de rotação automática (RM2155, Leica), equipado com navalha de vidro descartável, e corados com azul de toluidina (0,5%) em pH 4,0 (O'brien; Mccully, 1981), por 15 minutos. As lâminas foram montadas em resina sintética (Permunt®). A análise e a fotodocumentação foram realizadas em microscópio de luz (Olympus-AX 70) acoplado a um sistema de fotomicrografia (Olympus U-Photo) do Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal, da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

5. RESULTADOS

5.1 INDUÇÃO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA (ES)

A calogênese (93,05%) e o calo embriogênico (83,11%) não apresentaram diferença estatística entre as concentrações de 2,4-D (Figuras 2A e 2B, respectivamente). O número total de embriões (NTE) e a relação número total de embriões com a área média dos calos (NTE/AMC) apresentaram efeito quadrático, com o máximo de 44,33 embriões e maior relação NTE/AMC (0,43) em 2,4-D (Figuras 2C e 2E, respectivamente). A área média dos calos no final da fase de indução (180 dias), teve decréscimo no seu tamanho com o aumento das concentrações de PIC até 44,19 mm² na maior concentração (300 µmol L⁻¹) (Figura 2D).

Com o PIC, verificou-se efeito linear crescente para todas as variáveis analisadas (Figura 2), com exceção da calogênese (99,31%) (Figura 2A) e calo embriogênico (97,22%) (Figura 2B). Verificou-se aumento linear no NTE (8,33), com PIC (100 µmol L⁻¹), até o alcance de 76,33 embriões na maior concentração utilizada, 300 µmol L⁻¹ (Figura 2C). A área média dos calos no final da fase de indução (180 dias), aumentou em relação às concentrações de PIC, até 140,36 mm² na maior concentração de 300 µmol L⁻¹ (Figura 2D). A partir de 75 µmol L⁻¹, a relação NTE/AMC foi de 0,05, com aumento linear em função do aumento das concentrações de PIC, obtendo uma relação final 10 vezes maior (0,57) com 300 µmol L⁻¹ (Figura 2E).

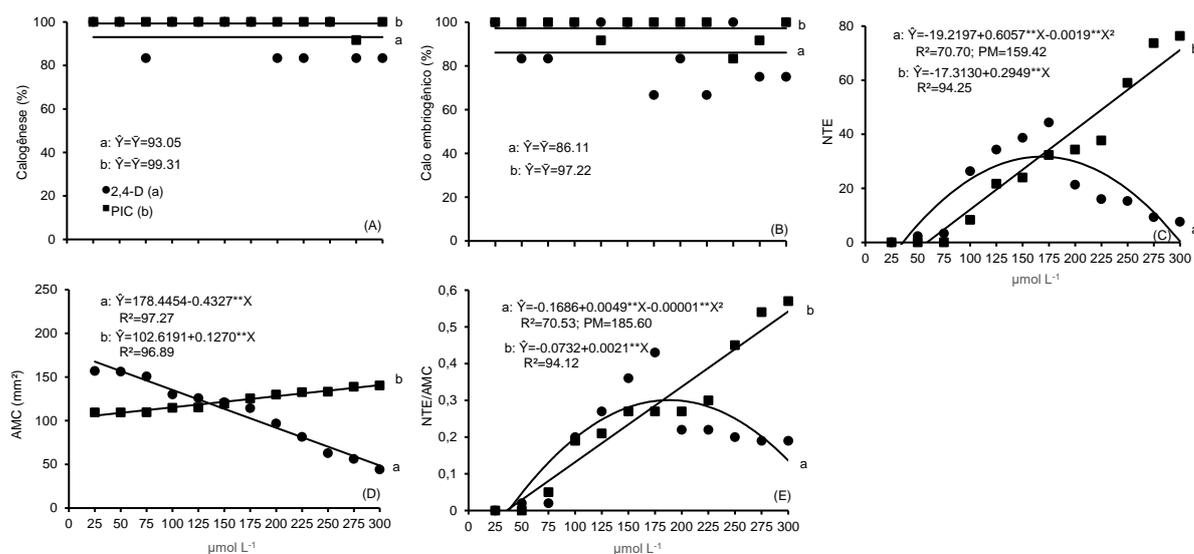


Figura 2. (A) Calogênese, (B) calo embriogênico, (C) número total de embriões somáticos, (D) área média dos calos, (E) relação do número total de embriões com a área média dos calos (E), para embriões zigóticos de *E. edulis*, em MI com diferentes concentrações de 2,4-D e PIC, após 180 dias. **Significativo em nível de 1% de probabilidade, pelo teste F.

Imagens obtidas na MEV durante a indução de embriões somáticos de *E. edulis*, com 100 dias de cultivo, em algumas concentrações de 2,4-D (50; 100; 175; 275 $\mu\text{mol L}^{-1}$), permitiram observar, na maioria dos calos, tecidos com características de massas embriogênicas (Figuras 3A, C, E) e não embriogênicas (Figura 3G). Alguns calos apresentaram superfície lisa e compacta, constituídos de células com formato alongado (Figura 3B, D e H), sem nenhuma evidência de formação de próembriões, com uma pequena exceção para o calo (Figura 3F) induzido com 2,4-D (175 $\mu\text{mol L}^{-1}$), em que algumas regiões apresentaram protuberâncias na superfície, indicando a formação de complexos pré-embriogênicos.

Na indução de embriões somáticos de *E. edulis*, constatou-se o desenvolvimento de estrutura mucilaginosa, macia e brilhante nos calos cultivados em 100 dias com PIC (125; 150; 250; 275 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (Figura 3I, K, M, O, respectivamente). Os calos formados a partir de embriões zigóticos, induzido com PIC, apresentaram-se embriogênicos, com uma região central compacta e a periférica com células tendendo ao isolamento.

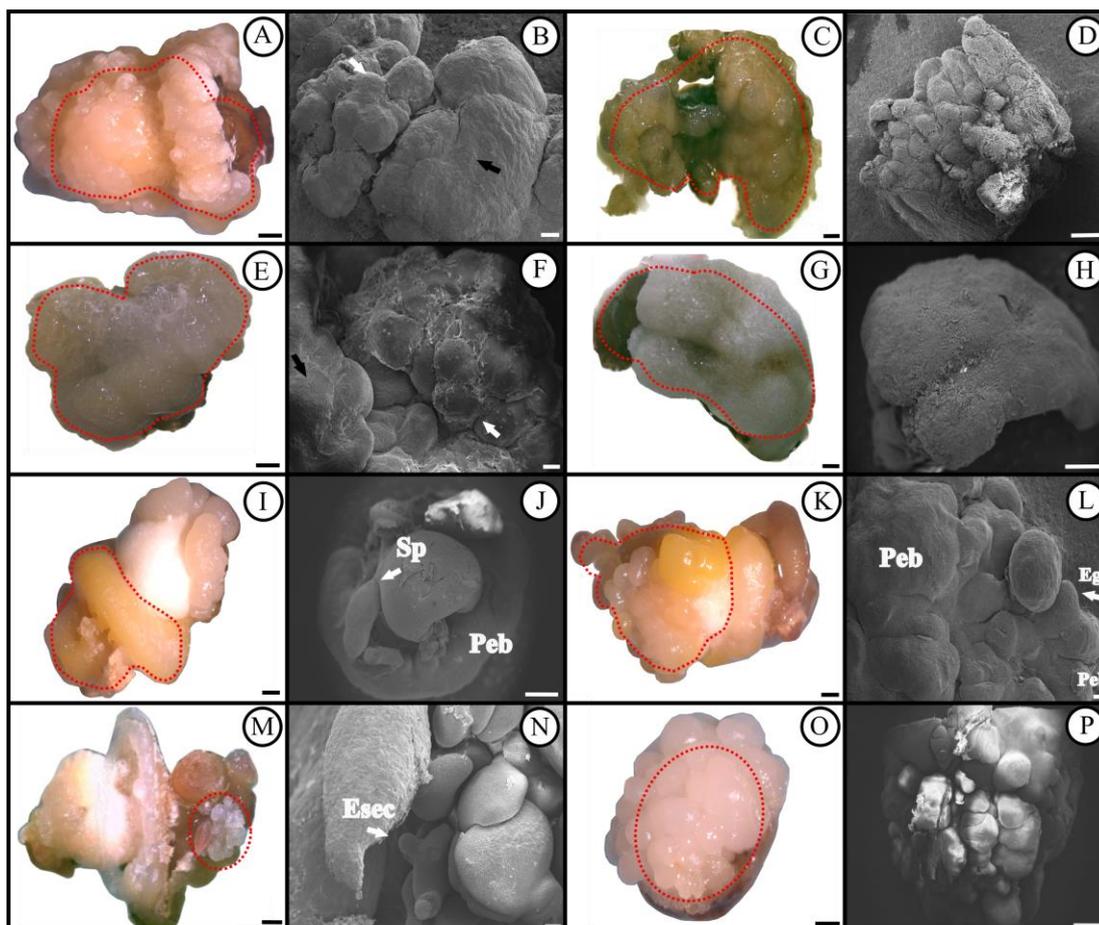


Figura 3. Calos com 100 dias da indução de embriões zigóticos com 2,4-D e PIC. (A) e (B) Embriogênese indireta com 2,4-D ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$); (B) MEV - Calo com maior área não embriogênica (seta preta) e, com algumas regiões embriogênicas (seta branca); (C) e (D) Calo induzido com 2,4-D ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$); (D) MEV - Estrutura de calo formado de massa não embriogênica; (E) e (F) Calo induzido com 2,4-D ($175 \mu\text{mol L}^{-1}$); (F) MEV - Estrutura de calo formado de massa não embriogênica (seta preta), com algumas regiões apresentando protuberâncias na superfície indicando a formação de complexos pré-embriogênicos (seta branca); (G) e (H) Calo induzido com 2,4-D ($275 \mu\text{mol L}^{-1}$); (H) MEV - Calo com estrutura lisa e compacta, formado de massa não embriogênica. (I) e (J) Calo induzido com PIC ($125 \mu\text{mol L}^{-1}$); (J) MEV - Presença de embriões somáticos em diferentes fases no mesmo calo, morfologicamente anormais apresentando suspensor (seta branca); (K) e (L) Calo induzido com PIC ($150 \mu\text{mol L}^{-1}$); (L) MEV - Presença de protuberâncias na superfície do calo indicando a formação de complexos pré-embriogênicos e formação de embrião globular (seta branca); (M) e (N) Calo induzido com PIC ($250 \mu\text{mol L}^{-1}$); (N) MEV - Presença de embriogênese secundária (seta branca); (O) e (P) Calo induzido com PIC ($275 \mu\text{mol L}^{-1}$); (P) MEV - Presença de protuberâncias na superfície do calo indicando a formação de complexos pré-embriogênicos. Abreviações: (Peb) próembriões, (Eg) embrião globular; (Sp) suspensor; (Esec) embriogênese secundária. Linhas tracejadas vermelhas indicam as áreas analisadas. Barras: $100 \mu\text{m}$ (L, J, N, P); $200 \mu\text{m}$ (B, D, F, H); $0,5 \text{ mm}$ (E, G); 1 mm (A, C, I, K, M, O).

Constatou-se o desenvolvimento de estruturas com morfologia celular isodiamétrica (Figura 3O), característica de calos embriogênicos. Foi possível observar o início do desenvolvimento de próembriões na superfície de calos embriogênicos (Figuras 3J, L, N, P), os quais progrediram para a formação de embriões globulares (Figura 3L), característicos e presença de suspensor (Figura 3J). O desenvolvimento foi assincrônico, sendo possível observar além das formas primárias da ES, embriões advindos de embriogênese secundária (Figura 3N).

A sequência de eventos anatômicos da ES a partir de embriões zigóticos em MI com 2,4-D (50; 75; 150; 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$), evidenciaram que os mesmos eram tecidos parenquimáticos circundando a região do cilindro central, constituídos por células parenquimáticas e feixes vasculares. Os calos (Figuras 4A, C, E, G) apresentaram desenvolvimento de arranjos granulares embriogênicos, aos 100 dias após cultivo em MI com 2,4-D. Próembriões foram caracterizados por células pequenas ricas em citoplasma (Figura 4B), os quais se manifestaram quando induzidos com 2,4-D (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

Os cortes anatômicos corados com azul de toluidina possibilitaram a visualização de células com características meristemáticas, sobretudo, naquelas avançando em direção à protoderme definida e ao procâmbio verificando a presença de embrião somático, quando utilizada 2,4-D (150 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (Figura 4F). Ao utilizar 2,4-D (75 $\mu\text{mol L}^{-1}$), verificou-se no procâmbio, elementos de vaso em diferenciação e meristema fundamental com citoplasma denso e fronteiro com a membrana plasmática (Figura 4D). Células em intensa divisão celular, presença de plúmula, localizada na cavidade cotiledonar em frente a fenda cotiledonar também foram verificadas nesta concentração (Figura 4D).

Nas imagens histológicas de calos induzidos com 2,4-D (200 $\mu\text{mol L}^{-1}$) observou-se células altamente vacuolizadas, com grandes espaços intercelulares e uma área basal do explante fusionada com células maiores, com menor intensidade mitótica, sem diferenciação de tecidos (Figura 4H). Também foram verificadas a presença de compostos fenólicos, promovido pela alta concentração de 2,4-D, coradas com azul de toluidina, inibindo o crescimento do explante (Figura 4H). Observou-se clusters embriogênicos quando utilizadas concentrações de 50 e 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e presença de células vacuolizadas não embriogênicas nas concentrações com 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 4H).

Observou-se o desenvolvimento de estruturas granulares embriogênicas (Figuras 4I, K, M, O), nos calos cultivados por 100 dias, em meio de cultura submetidos ao PIC (75; 125; 175; 200; 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente).

Foi possível observar clusters embriogênicos, seguidos por áreas com intensa divisão celular, sobretudo, naquelas avançando em direção à protoderme, com aparecimento de embrião globular, conectado por meio de estrutura semelhante ao suspensor, quando submetido à PIC (75 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (Figura 4J). A presença de xilema foi verificada nas Figuras 4L, N e P, quando induzidos com PIC (125; 200; 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$), respectivamente.

Quando induzido com PIC (125 e 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (Figuras 4L e 4N, respectivamente) foi observado a presença de próembriões, caracterizada por células pequenas ricas em citoplasma. Também foi observado a presença de células não embriogênicas, quando utilizado PIC (250 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (Figura 4L). A presença de compostos fenólicos também foi verificada, os quais foram provavelmente promovidos pela alta concentração de PIC (200 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (Figura 4F).

Os cortes anatômicos corados com azul de toluidina possibilitaram a visualização de células com intensas divisões celulares, principalmente naquelas avançando em direção à protoderme, sendo possível a distinção de regiões em organização esférica, semelhantes a embriões somáticos em estágio globular, quando utilizada as concentrações de 75 e 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figuras 4J e 4P).

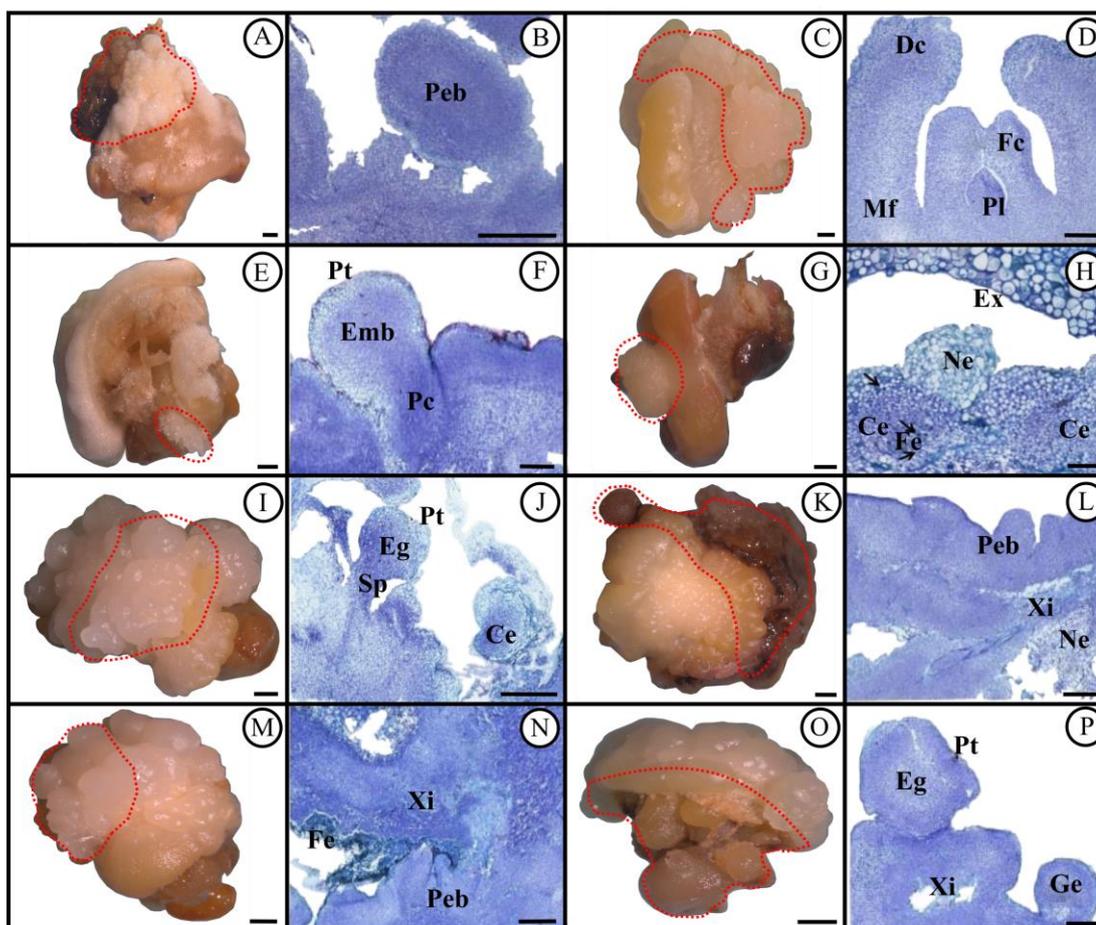


Figura 4. Eventos anatômicos da ES a partir de embriões zigóticos de *E. edulis* em MI com 2,4-D (50; 75; 150; 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e PIC (75; 125; 200; 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$). (A, C, E, G) Calos com estruturas granulares embriogênicas, aos 100 dias após cultivo em MI com 2,4-D (50; 75; 150 e 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente); (B) Próembrião caracterizado por células pequenas ricas em citoplasma; (D) Células em intensa divisão celular, presença de plúmula, localizada na cavidade cotiledonar em frente a fenda cotiledonar; (F) Áreas com intensa divisão celular, sobretudo, naquelas avançando em direção à protoderme, com aparecimento de embrião; (H) Presença de compostos fenólicos, pela alta concentração de 2,4-D, coradas com azul de toluidina (seta preta), presença de clusters embriogênicos, áreas não embriogênicas e área basal fusionada do explante. (I, K, M, O) Calos com estruturas granulares embriogênicas, aos 100 dias após cultivo em MI com PIC (75; 125; 200; 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$), respectivamente; (J) Agrupamentos de clusters embriogênicos, áreas com intensa divisão celular, sobretudo, naquelas avançando em direção à protoderme, com aparecimento de embrião globular, dada a presença de suspensor; (L) Próembriões, presença xilema e presença de células vacuoladas não embriogênicas; (N) Próembriões, clusters embriogênicos, fenólicos e áreas que normalmente recrutam a formação dos feixes vasculares (formação do xilema); (P) Áreas com intensa divisão celular, sobretudo, naquelas avançando em direção à protoderme, com aparecimento de embrião globular, e formação do xilema. Abreviações: (Pc) procâmbio; (Mf) meristema fundamental; (Fc) fenda cotiledonar; (Pl) plúmula; (Dc) divisão celular; (Ce) clusters embriogênicos; (Peb) próembriões; (Ne) calo não embriogênico; (Emb) embrião; (Pt) protoderme; (Ex) explante; (Fe) compostos fenólicos; (Xi) xilema; (Ne) calo não embriogênico; (Eg) embrião globular; (Sp) suspensor. Linhas tracejadas

vermelhas indicam as áreas analisadas. Barra: 0,5 μm (D, F, J, L, N, P); 1 μm (B); 1 mm (A, C, E, G, I, K, M, O).

5.2 DIFERENCIAÇÃO E MATURAÇÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS

Ao final dos 90 dias de maturação verificou-se diferenças significativas entre a oxidação (%OXI), cristalização (%CRI), embriogênese secundária (%ESEC), número de embriões somáticos (NES), número de embriões globulares (NEG) e número de embriões escutelares (NEE). A porcentagem de antocianina (%ANT), massa dos calos no início da fase de maturação (MCI) e massa dos calos no final da maturação (MCF), para os meios de maturação (MS; MS+PVP (1 g L⁻¹); MS+ CA (0,3 g L⁻¹) e MS+ CA (3 g L⁻¹)), e para a origem dos calos em 2,4-D (125; 150; 175 $\mu\text{mol L}^{-1}$), não apresentaram resultados significativos (Tabela 2A). Os meios de maturação diferiram entre si, quando combinados com a origem dos calos em 2,4-D (125; 150; 175 $\mu\text{mol L}^{-1}$), oriundos dos tratamentos da fase de indução.

Verificou-se diferença significativa entre as variáveis %ANT, %OXI, %CRI, MCI, MCF, %ESEC, NES, NEG, NEE, para os diferentes meios de maturação (MS; MS+PVP (1 g L⁻¹); MS+ CA (0,3 g L⁻¹) e MS+ CA (3 g L⁻¹)), e para as concentrações de PIC (250; 275; 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$), oriundas dos tratamentos da fase de indução (Tabela 2B).

Tabela 2. Meios de maturação (MS (controle); MS+PVP (1 g L⁻¹); MS+ CA (0,3 g L⁻¹); MS+ CA (3 g L⁻¹)) e origens dos calos da indução embriogênica em 2,4-D (A. 125; 150; 175 µmol L⁻¹) e PIC (B. 250; 275; 300 µmol L⁻¹) sobre antocianina (%ANT), oxidação (%OXI), cristalização (%CRI), embriogênese secundária (%ESEC), número de embriões somáticos (NES), número de embriões globulares (NEG) e número de embriões escutelares (NEE), massa dos calos no início da fase de maturação (MCI), massa dos calos no final da maturação (MCF), após 90 dias de cultivo nos respectivos meios de maturação

Variáveis (média)	2,4-D (125 µmol L ⁻¹)				2,4-D (150 µmol L ⁻¹)				2,4-D (175 µmol L ⁻¹)			
	MS (controle)	MS+PVP (1 g L ⁻¹)	MS+CA (0,3 g L ⁻¹)	MS+CA (3 g L ⁻¹)	MS (controle)	MS+PVP (1 g L ⁻¹)	MS+CA (0,3 g L ⁻¹)	MS+CA (3 g L ⁻¹)	MS (controle)	MS+PVP (1 g L ⁻¹)	MS+CA (0,3 g L ⁻¹)	MS+CA (3 g L ⁻¹)
OXI (%)	11,11c ¹	11,11c	11,11c	0,00c	0,00c	18,52ab	25,92a	0,00c	11,11c	11,11c	3,70c	14,81bc
CRI (%)	0,00b	25,92a	29,63a	0,00b	0,00b	11,07b	18,51ab	0,00b	0,00b	25,92a	29,63a	0,00b
ESEC (%)	0,00b	14,81a	14,81a	0,00b	0,00b	3,70b	3,70b	0,00b	1,11ab	14,81a	14,81a	0,00b
NES (un)	2,69c	13,48b	8,33c	3,78c	0,44c	13,68a	8,55c	1,12c	3,70c	9,89bc	13,55ab	6,35c
NEG (un)	2,69d	11,67ab	4,44d	3,56d	0,44d	11,22b	7,22d	0,56d	3,26d	8,67cd	13,44a	6,35d
NEE (un)	0,00b	1,81b	3,89a	0,22b	0,00b	2,46b	1,33b	0,56b	0,44b	1,22b	0,11b	0,00b
Variáveis (média)	PIC (250 µmol L ⁻¹)				PIC (275 µmol L ⁻¹)				PIC (300 µmol L ⁻¹)			
	MS (controle)	MS+PVP (1 g L ⁻¹)	MS+CA (0,3 g L ⁻¹)	MS+CA (3 g L ⁻¹)	MS (controle)	MS+PVP (1 g L ⁻¹)	MS+CA (0,3 g L ⁻¹)	MS+CA (3 g L ⁻¹)	MS (controle)	MS+PVP (1 g L ⁻¹)	MS+CA (0,3 g L ⁻¹)	MS+CA (3 g L ⁻¹)
ANT (%)	1,11bc ¹	11,11bc	18,52a	0,00c	0,00c	0,00c	3,70c	0,00c	0,00c	14,81ab	22,21a	0,00c
OXI (%)	0,00b	29,63a	14,81ab	0,00b	0,00b	11,11ab	11,11ab	0,00b	0,00b	7,41b	11,11ab	0,00b
CRI (%)	0,00c	11,10a	11,11a	0,00c	0,00c	7,42ab	11,11a	0,00c	11,11a	3,70bc	11,11a	0,00c
MCI (g)	0,20b	0,23b	0,25b	0,26b	0,28b	0,30ab	0,24b	0,30ab	0,22b	0,24b	0,23b	0,33
MCF (g)	0,37b	0,32b	0,44b	0,49b	0,55ab	0,40b	0,37b	0,53b	0,37b	0,36b	0,38b	0,59
ESEC (%)	14,81a	11,10ab	11,11ab	0,00c	11,11ab	0,00c	3,70bc	0,00c	0,00c	3,70bc	11,11ab	0,00c
NES (un)	10,89b	12,78b	11,33b	12,87b	6,78b	10,16b	9,89b	1,11b	2,56b	16,67a	14,00ab	0,00b
NEG (un)	4,00b	10,47b	10,64b	11,88b	6,11b	10,16b	9,89b	1,11b	2,56b	16,67a	10,68b	0,00b
NEE (un)	6,89a	2,31bc	0,69c	0,99b	0,67c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	3,32b	0,00c

¹Médias seguidas pela mesma letra na "linha" não diferenciam significativamente entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p \leq 0.005$).

A morfologia de calos e embriões somáticos obtidos durante a ES de *E. edulis*, a partir de embriões zigóticos, em meio de maturação, e calos oriundos do experimento de indução com 2,4-D e PIC, são apresentados na Figura 5, respectivamente: início da maturação de embriões somáticos aos 30 dias de cultivo, com coloração esbranquiçada (Figuras 5A e 5F); embriões somáticos em fase de maturação aos 60 dias (Figuras 5B e 5G); embriões somáticos globulares na superfície do calo aos 90 dias de cultivo na fase de maturação, com evidente coloração esbranquiçada (Figuras 5C e 5H); ES secundária (Figuras 5D e 5I) e embriões somáticos em estágio escutelar (Figuras 5E e 5J).

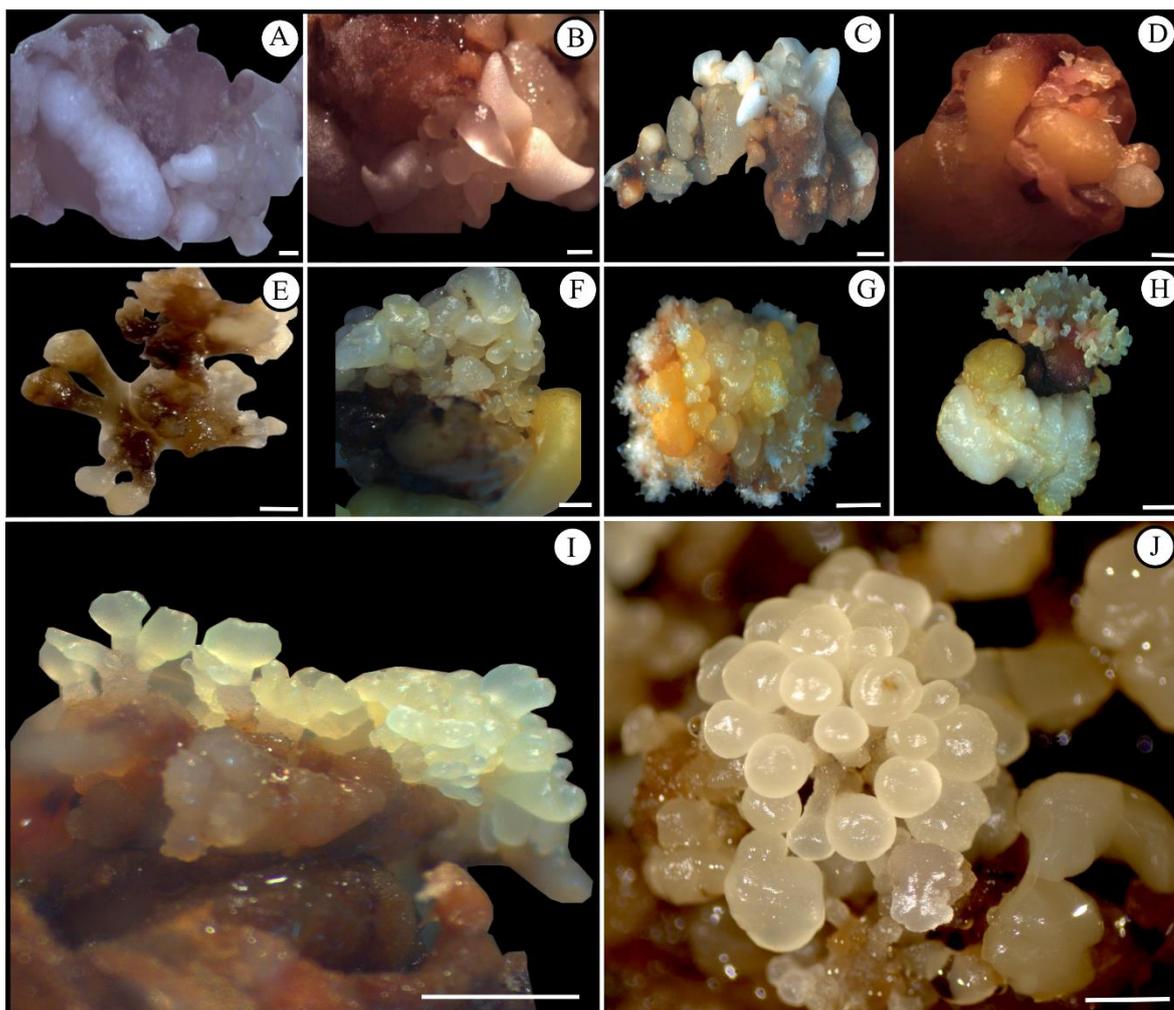


Figura 5. Morfologia de calos e embriões somáticos obtidos durante a ES de *E. edulis*, a partir de embriões zigóticos, em meio de maturação. (A) a (D) Calos em meio 2,4-D ($125 \mu\text{mol L}^{-1}$); MS + PVP (1 g L^{-1}) (A) Início da maturação de embriões somáticos aos 30 dias de cultivo, com coloração esbranquiçada; (B) embriões somáticos em fase de maturação aos 60 dias; (C) Embriões somáticos globulares na superfície do calo aos 90 dias de cultivo na fase de maturação, com evidente coloração esbranquiçada; (D) ES secundária; (E) Embriões somáticos em estágio escutelar (2,4-D ($125 \mu\text{mol L}^{-1}$); MS + CA ($0,3 \text{ g L}^{-1}$)); (F) Início da maturação de embriões somáticos aos 30 dias de cultivo, com coloração esbranquiçada (PIC ($300 \mu\text{mol L}^{-1}$); MS + PVP (1 g L^{-1})); (G) embriões somáticos em fase de maturação aos 60 dias (PIC ($300 \mu\text{mol L}^{-1}$); MS + PVP (1 g L^{-1})); (H) Embriões somáticos globulares na superfície do calo aos 90 dias de cultivo na fase de maturação, com evidente coloração esbranquiçada (PIC ($300 \mu\text{mol L}^{-1}$); MS + PVP (1 g L^{-1})); (I) ES secundária (PIC ($250 \mu\text{mol L}^{-1}$); MS (controle)); (J) Embriões somáticos em estágio escutelar (PIC ($250 \mu\text{mol L}^{-1}$); MS (controle)). Barra: 1 mm (D, F, G, H, I); 2 mm (A, B, C, E, J).

5.3 GERMINAÇÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS

Ao final dos 90 dias da fase de germinação foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos, sem pulso de auxinas (controle), com pulso de ANA e AIB, sendo que a maior porcentagem de germinação de embriões somáticos foi observada em embriões somáticos provenientes do meio de germinação sem pulso de auxinas (75%) (Tabela 3). Verificou-se aos 60 dias de cultivo o início de protrusão da raiz primária e emergência das plúmulas dos embriões somáticos, caracterizado como início da germinação (Figura 6A). Aos 90 dias, os embriões germinados apresentavam, na extremidade da parte aérea, coloração mais esbranquiçada e raiz primária com coloração avermelhada, sendo esta, mais alongada e intumescida (Figura 6B), e aos 120 dias, verificou-se a conversão em plântulas (Figuras 6C e 6D).

As plantas regeneradas a partir do processo de embriogênese foram retiradas do tubo de ensaio após atingirem cerca de 3 cm e enxaguadas com água corrente para remover o excesso de meio. Posteriormente, foram plantadas em copo descartável de 250 mL e preenchido com substrato Carolina Soil[®], que foi autoclavado por 30 min. O copo plástico foi coberto com um pequeno saco plástico transparente por 5 dias para evitar a desidratação (Fig. 6E) e depois removido (Fig. 6F), sendo mantido em sala de crescimento a 27 ± 1 ° C.

Tabela 3. Germinação *in vitro* de embriões somáticos de *E. edulis*, com ou sem pulso das auxinas ANA e AIB

Auxinas (2000 mg L ⁻¹)	Germinação (%)
Sem pulso auxínico (controle)	75,00a ¹
ANA	50,00b
AIB	0,00c

¹Médias seguidas pela mesma letra na "coluna" indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p \leq 0.005$).

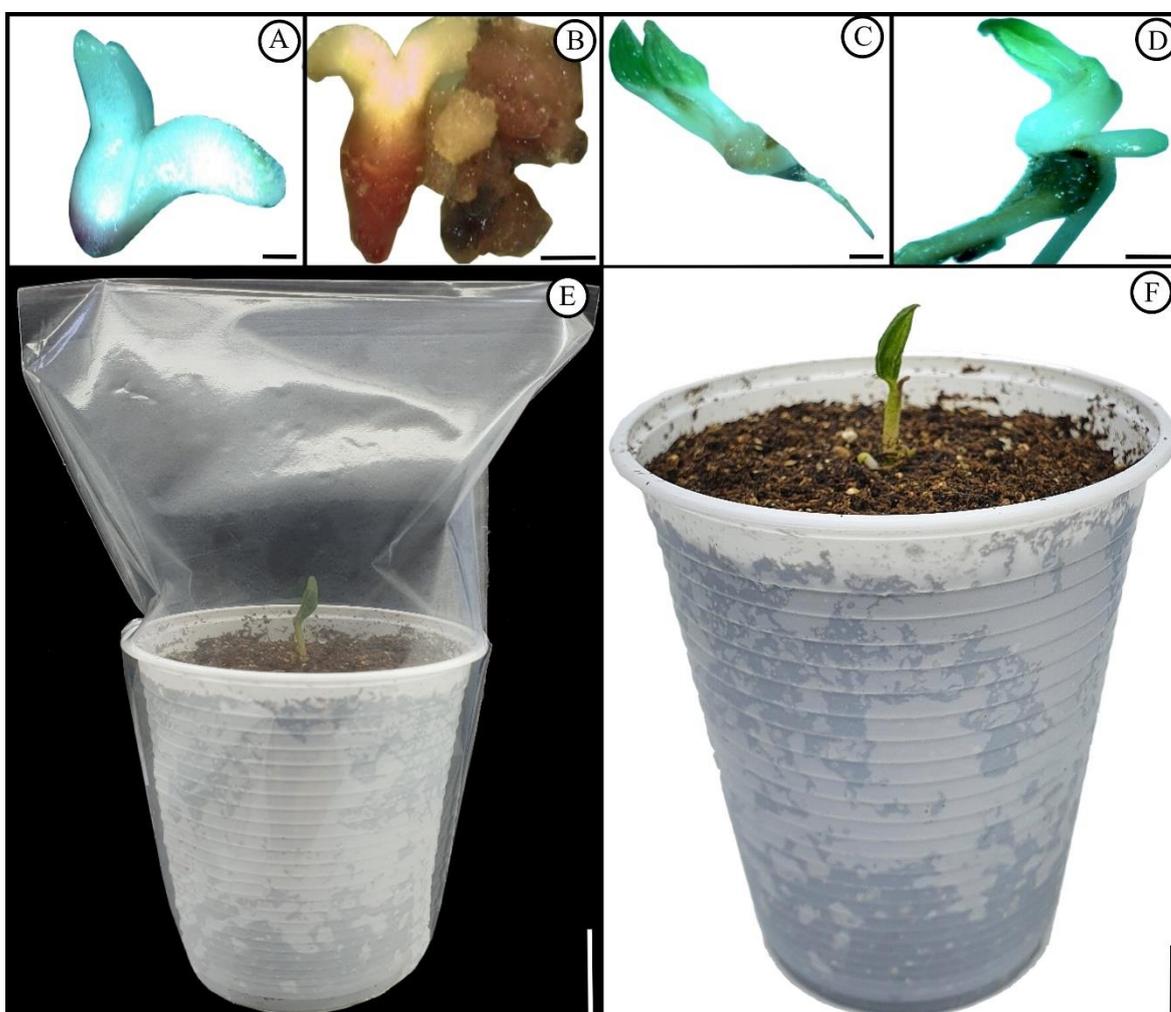


Figura 6. Germinação de embriões somáticos de *E. edulis*, a partir de embriões zigóticos de frutos imaturos. (A e B) Embrião somático formado em meio de germinação sem auxinas, aos 60 e 90 dias de cultivo, respectivamente. (C e D) Plântulas somáticas formadas em meio sem pulso auxínico aos 120 dias de cultivo. (E e F) Aclimatização de plantas regeneradas a partir da embriogênese somática. Barras: 1mm (A, B, C, D), 1 cm (E, F).

6. DISCUSSÃO

6.1 INDUÇÃO DA ES

Independente da concentração de 2,4-D a formação de calos embriogênicos foi elevada, acima de 90%. Enquanto o NTE e a relação NTE/AMC houve um aumento até atingir o ponto de máximo com 159,42 e 186,60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de 2,4-D respectivamente. A maioria dos estudos utilizam altas concentrações da auxina 2,4-D, acima de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, Balzon et al. (2013) obtiveram uma frequência de calos embriogênicos, procedentes de embriões zigóticos de *E. guineensis*, de 79,4 % em resposta ao uso de 450 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de 2,4-D.

Karun et al. (2004) utilizaram como fonte de explante folhas de plântulas cultivadas *in vitro* de *A. catechu*, mas não obtiveram resposta quanto à produção de calos embriogênicos com a concentração de 68 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de 2,4-D. Huong et al. (1999) observaram que concentrações maiores que 90,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de 2,4-D inibiram a indução de calo embriogênico em *Phoenix canariensis* Hort. ex Chabaud. Assim a concentração de auxina tem se mostrado variável entre as espécies de palmeiras estudadas. Auxinas sintéticas, como o 2,4-D, tem efeito na ES relacionada à sinalização como auxina e como componente gerador de estresse, sendo esse, um importante fator relacionado à aquisição da competência embriogênica (Fehér et al., 2003).

A multiplicação de células com características embriogênicas nas adjacências dos calos, também pode estar relacionada ao maior aporte de

fitorreguladores nessas áreas e pelo contato com o meio de cultura (Liu et al., 2014; Jiang et al., 2015).

Houve diminuição da área média dos calos (AMC) em função da ocorrência de oxidação com o aumento das concentrações de 2,4-D (Figura 2D). Em palmeiras, a oxidação de tecidos cultivados *in vitro* é um problema recorrente (Sugimura; Salvana, 1989; Teixeira et al., 1994; Steinmacher et al., 2007abc; Sáenz et al., 2010), principalmente quando são cultivados em concentrações elevadas de auxinas (Ledo et al., 2002). Freitas et al. (2016) trabalhando com embriões zigóticos de *Euterpe oleracea* observaram oxidação de até 100% dos explantes em meio de cultura com 2,4-D à 450 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os efeitos deletérios do processo de oxidação se devem à liberação de compostos fenólicos de tecidos *in vitro*, ocasionando o escurecimento dos explantes (Jones; Saxena, 2013) e inibindo o crescimento celular (Naz et al., 2008; Ahmad et al., 2013).

Da mesma forma que nos tratamentos com 2,4-D, independente das concentrações de PIC (25 a 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$) a formação de calogênese e calos embriogênicos foram elevados, apresentando valores acima de 90% (Figuras 2A e 2B). Para *E. oleracea*, Scherwinski-Pereira et al. (2012), utilizando PIC na concentração de 450 $\mu\text{mol L}^{-1}$ obtiveram 44,8% de formação de calo. Nesta mesma concentração, Meira et al. (2020), em estudos com *A. aculeata*, obtiveram 58,3% de calogênese. Em *E. guineenses*, Balzon et al. (2013), obtiveram 97,5% de calos embriogênicos com 450 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PIC. Steinmacher et al. (2007c), obtiveram 43,0% de calo embriogênico em explantes foliares cultivados em PIC (300 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

Observa-se que na medida em que se aumenta a concentração de PIC os valores do NTE, AMC e NTE/AMC também aumentam. A observação crescente dos valores das variáveis analisadas, sugere maior eficácia na absorção e mobilização do PIC, juntamente com a metabolização mais rápida nas “células alvo”, ou seja, grupos de células que possuem centros ativos de divisão celular (competentes), presentes nos explantes. Segundo Karun et al. (2004), o efeito do PIC durante a ES se deve à efetividade na sua absorção e mobilização, bem como a sua rápida metabolização em sítios específicos, que são normalmente enzimas ou proteínas carreadoras de elétrons, ou que contribuem para a regulação hormonal. Salienta-se que a literatura é escassa em termos da

compreensão detalhada dos eventos fisiológicos envolvidos na atuação do PIC na indução e desenvolvimento de rotas morfogênicas (Silva-Cardoso et al., 2019).

A superfície dos calos induzidos em meio com 2,4-D desenvolveram tecidos alongados, e alguns parcialmente envolvidos por matriz extracelular. Tais tecidos circundam a região central do calo seguindo em diversas orientações, encontrando-se, por vezes, desconectadas e distantes da região central, correspondem às células longas seccionadas transversalmente, as quais se mantêm ligadas ao calo (Figura 3D). Verdeil et al. (2001) também observaram que o aparecimento de matriz extracelular cobrindo as células associado com a aquisição de competência embriogênica de calos de *C. nucifera*.

Conforme análises das seções histológicas dos calos verificou-se que foram suficientes para promover alterações anatômicas visíveis a nível celular, como clusters embriogênicos, presença de células vacuolizadas não embriogênicas, próembriões, procâmbio, meristema fundamental, células em intensa divisão celular, presença de compostos fenólicos, formação de protoderme. A formação da protoderme, meristema fundamental e procâmbio, ocorrem durante a fase de desenvolvimento dos embriões somáticos, no entanto, pode variar em sequência e tempo, de acordo com as condições de cultivo. Por exemplo, em *A. aculeata* a formação de protoderme foi observada em embriões somáticos no início da fase globular (Moura et al., 2008), o mesmo observado neste estudo. Estudos realizados com *Bactris gasipaes* (Maciel et al., 2010; Steinmacher et al., 2011), e *A. aculeata* (Moura et al., 2010) indicaram que a formação da protoderme durante a indução da embriogênese somática de estruturas globulares já são características de pequenos embriões imaturos.

As seções histológicas dos calos obtidos demonstravam uma diferenciação bastante evidente em relação aos tecidos originais. Após os 100 dias de cultivo, a estrutura do explante já estava altamente modificada e sua epiderme mostrava-se completamente descontínua. A protoderme se modificou inteiramente, tanto por deposição de fenólicos, quanto pela divisão celular, gerando novas camadas de células. Os cordões procambiais sofreram multiplicações e diferenciação dos tecidos. Essas modificações fornecem evidências de que células de embriões zigóticos de *E. edulis* são competentes às condições indutoras *in vitro*, sobretudo, aquelas células localizadas nas proximidades do eixo embrionário, nas adjacências dos cordões procambiais e na

protoderme. A presença de células originadas da periferia de estruturas globulares, também foi observada em embriões somáticos em *A. aculeata* (Moura et al., 2008).

As análises dos cortes anatômicos dos calos cultivados em meio de indução com 2,4-D mostraram a presença de zonas meristemáticas (regiões mais coradas com azul de toluidina), formadas por aglomerados de células meristemáticas e zonas embriogênicas (Figura 4D). Em indução de calo a partir de embriões zigóticos de *A. aculeata* e *E. oleracea*, Moura et al. (2008) e Scherwinski-Pereira et al. (2010), respectivamente, também verificaram a presença de uma região meristemática. A maioria das características supracitadas, observadas nos cortes histológicos, sugerem como células embriogênicas, ou seja, capazes de formar embriões somáticos, como também foi observado por diversos autores (Guerra; Handro, 1998; Zegzouti et al., 2001; Kurczynska et al., 2007; Silva et al., 2015; Pilarska et al., 2016 e Oliveira et al., 2017).

Por meio das análises histológicas a partir de calos formados de embriões zigóticos de *E. edulis* induzidos com PIC (Figura 4), verificou-se uma desorganização da estrutura do explante onde evidenciou-se a existência de centros meristemáticos com intensa divisão celular levando à formação de células pequenas, arranjadas compactamente com citoplasma denso e com capacidade embriogênica. Segundo Fehér et al. (2003) a presença desses centros primários seguidos da formação de um órgão, está relacionada à capacidade de uma célula em responder a sinais específicos como os gerados pela ação dos hormônios. Foi possível observar intensa atividade mitótica, podendo evidenciar a presença de clusters embriogênicos, próembriões e embriões somáticos em fase globular. Essas características sugerem intensa síntese de RNA e ampla atividade metabólica. O fato de alguns dos embriões terem chegado a fases mais avançadas pode estar relacionado com a competição entre os próembriões (Moura et al., 2008).

Os calos cultivados em meio de indução com PIC podem ser classificados com potencial embriogênico, pois a presença de células meristemáticas e embriogênicas foram predominantes em sua totalidade, onde as áreas coradas com azul mais intenso indicaram que as células estão em alta atividade de divisão celular (Figura 4). Além disso, foram verificadas células com características

meristemáticas próximas aos feixes vasculares, e a presença de alguns próembriões na região próxima aos feixes e a região meristemática. Konieczny et al. (2012), identificaram calos que apresentavam aparência friável e localizado abaixo da epiderme do explante mostrando a presença de pequenas células meristemáticas de arranjo compacto e com citoplasma denso.

Calos induzidos pelo PIC apresentaram estruturas globulares semelhantes a embriões somáticos, que se formaram a partir dos calos nodulares gerados no período de indução. A indução de calo nodular a partir da multiplicação de células perivasculares foi observada em *E. guineensis* (Schwendiman et al., 1988), em *C. nucifera* (Buffard-Morel et al., 1992) e em *E. edulis* (Guerra; Handro, 1998), mas utilizando explantes foliares.

Em estudos histológicos realizados em culturas embriogênicas *in vitro* de *E. edulis* oriundas de embriões zigóticos, observou-se evidências da origem das massas meristemáticas a partir de tecidos da subepiderme (Guerra; Handro, 1998). Além disso, esses autores descreveram os diferentes estádios de maturação dos próembriões e os embriões obtidos durante o processo. Em *B. odorata* obteve-se células embriogênicas e próembriões, bem como zonas meristemáticas, onde o PIC nas concentrações de 150, 300 e 450 $\mu\text{mol L}^{-1}$, foi mais efetivo na indução de calos embriogênicos e embriões somáticos em comparação com o 2,4-D (Campos et al., 2020).

Ao final dos 100 dias de cultivo na fase de indução houve rompimento dos tecidos do explante devido à intensa multiplicação celular e degeneração do meristema fundamental (Figuras 4H e 4L). Os cordões de procâmbio sofreram intensas multiplicações e diferenciação dos tecidos (Figuras 4D, F, H, L, N e P). A protoderme se modificou inteiramente, tanto por deposição de fenólicos, quanto pela intensa divisão celular, gerando novas camadas de células (Figura 4F). Geralmente, ao se utilizar embriões zigóticos como explantes, a ES em palmeiras se origina de células da protoderme, ou de células subepidermais (Guerra; Handro, 1998; Kanchanapoom; Domyoas, 1999; Wang et al., 2006).

As estruturas globulares se fragmentaram a partir das massas meristemáticas formadas a partir das células procambiais ou de divisões de células da região próxima aos cordões procambiais. Eventualmente, embriões somáticos se formaram a partir dessas massas embriogênicas com estruturas globulares (Figuras 4J e 4P). Os embriões apresentaram aspecto de origem

unicelular, por se mostrarem independentes do tecido de origem. Esses embriões apresentaram protoderme definida e não ligada ao tecido de origem. As células procambiais podem ser consideradas como células-tronco vasculares pluripotentes e estão relacionadas à diferenciação em células do floema e do xilema, além de outros tecidos durante a ES (Rocha et al., 2016).

Outra estrutura encontrada foi o suspensor, responsável por conectar o embrião ao sistema vascular, provendo o próembrião com nutrientes e hormônios necessários para o seu desenvolvimento (Figura 4J). Além disso, há indícios de que o suspensor esteja envolvido na produção e transporte de proteínas para o próembrião, visto que suas células podem apresentar níveis extremamente elevados de síntese proteica (Floh et al., 2015).

6.2 DIFERENCIAÇÃO E MATURAÇÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS

Na fase de diferenciação e maturação, observou-se que a substituição de um meio com 2,4-D (indução) para um meio de cultura com a combinação ANA+2iP (maturação), manteve o potencial embriogênico das culturas, sendo observados estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos (globular e escutelar), o que caracterizou um processo de embriogênese assincrônica, isto muito provavelmente devido ao efeito residual de 2,4-D nos calos. Resultados semelhantes também foram obtidos na fase de maturação de *E. edulis*, ao transferir os calos de um meio com auxinas para um meio de cultura com 2iP e ANA para prosseguir com a expressão da ES em embriões somáticos (Guerra; Handro, 1988; Guerra; Handro, 1998).

Aos 90 dias de cultivo, observou-se aglomerados de embriões no estágio escutelar, com aspecto esbranquiçado, característica de embriões somáticos já passando para o estágio coleoptilar (Figuras 5C, D e E). A combinação ANA e 2iP é utilizada nesta fase, em grande parte dos protocolos de embriogênese somática, para espécies de palmeiras, com resultados que mostram a maturação dos embriões até a fase de escutelar (Balzon et al., 2013; Freitas et al., 2016). Ledo et al. (2002), observaram que o meio de cultura suplementado com ANA e 2iP foi eficiente para a multiplicação e manutenção de calos embriogênicos de *E. oleracea*, além de promover a progressão em estádios mais avançados dos embriões somáticos.

Calos apresentaram oxidação (25,92%) mesmo utilizando CA (0,3 g L⁻¹), principalmente aqueles oriundos do MI com 2,4-D (150 µmol L⁻¹) (Tabela 2A). Os demais tratamentos, principalmente com PVP (1 g L⁻¹) e CA (3 g L⁻¹), apresentaram aparentemente menos fenóis e conseqüentemente menor oxidação, provavelmente devido à adsorção mais pronunciada do 2,4-D nas demais concentrações, reduzindo ou eliminando seus efeitos fitotóxicos. Durante a fase de maturação alguns calos iniciaram o processo de oxidação, que ocorreu provavelmente por causa da baixa concentração do CA (0,3 g L⁻¹). *E. edulis* e *E. oleracea* responderam de forma satisfatória ao uso de CA na ES a partir de embriões zigóticos de frutos imaturos, com 2,4-D (100 mg L⁻¹) (Saldanha; Martins-Corder, 2012). O PVP (0,2 mg L⁻¹) em segmentos nodais de *Olea europea* L., não controlou as altas taxas de oxidação (Pinheiro et al., 2013), estes autores, concluíram que aumentando a concentração de PVP, diminui-se a taxa de oxidação, assim como verificado por Córdova et al. (2014), em que a imersão de segmentos nodais de *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh, com PVP (2 mg L⁻¹) no meio de cultura MS se mostrou eficiente para evitar a oxidação dos explantes.

Calos com aparência vítrea foram observados no material estudado, apresentando 29,63% de cristalização quando cultivados em meio com CA (0,3 g L⁻¹), oriundos da fase de indução com 2,4-D (175 µmol L⁻¹). Na variável NES, houve diferenças significativas quanto ao uso dos meios de maturação, maiores valores desta variável foram observados quando utilizado calos da concentração 150 µmol L⁻¹ de 2,4-D em meio com 1 g L⁻¹ PVP (NES = 13,68 embriões) (Tabela 2A). Condições de cultivo como, por exemplo, luminosidade e trocas gasosas constituem fatores de ocorrência à vitrificação dos calos (Villa et al., 2010), como observado neste estudo.

Observou-se a ocorrência de embriogênese secundária (14,81%) em calos oriundos das três concentrações de 2,4-D (125, 150 e 175 µmol L⁻¹) e PIC (250 µmol L⁻¹). Resultados semelhantes foram evidenciados em estudos com outras palmeiras, em que os embriões somáticos apresentavam ocorrência de embriogênese secundária (Steinmacher et al., 2007abc; Scherwinski-Pereira et al., 2010; Silva et al., 2012). Isto pode ser vantajoso para a propagação de plantas, devido ao aumento do número de embriões somáticos formados ao final do processo embriogênico (Raemakers et al., 1995), além de poder exibir melhor desenvolvimento do que aqueles obtidos via embriogênese somática primária

(Pérez-Núñez et al., 2006). Sendo assim, considerando a eficácia da embriogênese secundária na formação de embriões somáticos e sua conversão, sugere-se maior atenção aos tratamentos em que houve a formação de embriões secundários e a realização de novas investigações e estudos.

A conversão de embriões para o estágio escutelar (NEE) (Figura 5E) foram em média 3,89 embriões quando cultivados em meio com CA ($0,3 \text{ g L}^{-1}$), para todos os tratamentos de origem, e os calos oriundos de MI com 2,4-D ($125 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) (Tabela 2A). Ressalta-se que o processo foi nitidamente assincrônico, apresentando embriões somáticos fusionados, o que pode estar relacionado com a disformidade durante a polarização das unidades embriogênicas de origem multicelular (Michaux-Ferrière et al., 1992). Essa assincronia, característica comum em outros sistemas embriogênicos (Steinmacher et al., 2007b; Correia, Canhoto, 2010; Scherwinski-Pereira et al., 2010; Pádua et al., 2017), é explicada por Gray et al. (1995) como consequência da exposição de embriões somáticos, iniciados em diferentes momentos, às mudanças nos regimes de nutrientes durante os subcultivos.

Na maturação, os calos oriundos da indução com PIC (principalmente $250 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) com PVP foram os que apresentaram maior oxidação (29,63%). Karun et al. (2004), testando as auxinas 2,4-D, e PIC na indução da embriogênese somática e regeneração de plantas, demonstraram que o PIC promoveu as maiores taxas de oxidação dentre as auxinas testadas, sendo que a concentração que mais oxidou os explantes foi a de $200 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Segundo Siqueira e Inoue (1991), o PVP ($1,0 \text{ g L}^{-1}$) não diminuiu a oxidação de explantes de *C. nucifera*. Da mesma maneira, Biasi et al. (1999), não encontraram efeito positivo do PVP (10 e 20 g L^{-1}) na redução da oxidação em *Diospyrus kaki* L. Os resultados encontrados neste trabalho corroboram com os obtidos pelos autores supracitados, no que se refere a ineficiência do PVP na redução da oxidação de explantes, quando utilizado PIC.

Verificou-se coloração violácea de antocianina nos calos embriogênicos, principalmente os de PIC $300 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, quando utilizado no meio com CA ($0,3 \text{ g L}^{-1}$) com média de 22,21% de calos com esta pigmentação (Tabela 2B). O acúmulo de antocianina pode estar relacionado a fatores como a radiação solar e as fontes de fitorregulador (Ikram-Ul-Haq; Zafar, 2004). Há relatos na literatura que descrevem tanto efeitos inibitórios quanto estimuladores das auxinas na

biossíntese de antocianinas. Em culturas de células de *Fragaria* spp. L., Mori et al. (1994) e Loreti et al. (2008), observaram um efeito indutor, enquanto aplicações *in vivo* de auxina em *Vitis vinifera* L., levaram a um efeito inibidor da pigmentação (Jeong et al., 2004). Outro fator a se considerar está relacionado à altitude. Como um dos benefícios da antocianina está na capacidade de fotoproteção, há coerência em se esperar que plantas expostas a altitudes mais elevadas apresentem maiores concentrações de antocianina como uma tentativa de proteção, o que pode ser observado neste estudo, possivelmente devido à maior altitude na qual os explantes foram coletados.

Na fase de maturação a formação de aglomerados esbranquiçados, oriundos de MI com PIC, progrediram para a formação de clusters embriogênicos isodiamétricos seguido do aumento dos embriões somáticos em fase globular. Além de um aumento no tamanho dos calos oriundos das concentrações de PIC (250, 275 e 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Segundo Machado et al. (2006), esse aumento de tamanho pode ter ocorrido devido a dois possíveis fatores, à absorção de água, gerando um potencial de turgescência que atua sobre a membrana e a parede celular, e resultando no aumento da pressão interna e inchaço da célula; e ao efeito da auxina, no caso o PIC, atuando sobre o alongamento celular.

Ocorreu a conversão e evolução dos embriões somáticos já formados para estágio escutelar no PIC (300 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em meio com PVP (1 g L⁻¹). O embrião do tipo escutelar pode ser considerado como estádios promissores, com capacidade de gerar plântulas, fato este que pode estar relacionado com as menores exigências em balanço nutricional dos meios de cultura, bem como o tempo de permanência em cultivo *in vitro* (Amaral et al., 2000).

6.3 GERMINAÇÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS

Observou-se que os embriões cultivados no meio de germinação constituídos por meio MS, suplementados com BAP e GA₃, sem o pulso com ANA e AIB, foram mais eficientes na germinação dos embriões somáticos de *E. edulis*, verificando um valor de 75% de germinação. Ocorreu baixa regeneração das plantas germinadas, contudo as que regeneraram (dados não apresentados) apresentaram desenvolvimento normal, com verificação de parte aérea e raízes. De acordo com Von Arnold et al. (2002), o sucesso da sobrevivência e

crescimento de plantas regeneradas depende das condições fornecidas nas fases anteriores *in vitro*. Freitas et al. (2016) utilizando BAP ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$) e GA₃ ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) no meio de regeneração, verificaram que os embriões somáticos de *E. oleracea*, iniciaram a germinação aos 60 dias, obtendo uma conversão de 58,7% em plântulas. Em *Melia azedarach* L., a germinação de 100% dos embriões somáticos foi obtida quando esses foram transferidos para um meio com baixas concentrações de BAP ($0,01 \text{ mg L}^{-1}$) e GA₃ ($0,2 \text{ mg L}^{-1}$) e sem pulso de auxinas (Sharry et al., 2006).

Embriões somáticos podem ser transferidos para diferentes meios de germinação, que pode ser suplementado com GA₃ (Kayim; Koc, 2006; Abreu et al., 2014; Nuño-Ayala et al., 2012), com diferentes combinações de citocininas e auxinas (Clarindo et al., 2008; Sun et al., 2011), ou desprovido de fitorreguladores (Simões et al., 2010; Texeira et al., 2011; Pinheiro et al., 2012), para que ocorra a germinação e a conversão em plântulas. Sendo assim, a fase anterior à germinação, no caso a maturação, se torna uma etapa fundamental para o desenvolvimento do embrião, e para a subsequente germinação e desenvolvimento da plântula (Perán-Quesada et al., 2004).

7. RESUMO E CONCLUSÕES

Neste trabalho utilizou-se a técnica da embriogênese somática como forma de propagação da espécie *Euterpe edulis* Martius, devido sua importância ecológica, valor cultural e de grande interesse econômico.

Os resultados obtidos confirmaram a possibilidade de propagar a palmeira *E. edulis*, a partir de embriões zigóticos imaturos, por meio da embriogênese somática, utilizando os fitorreguladores 2,4-D e picloram na fase de indução e seus efeitos residuais nas demais fases da embriogênese somática.

Observou-se a formação de calogênese, calos embriogênicos e embriões somáticos que evoluíram à formação de plântulas somática completas, atestando a eficácia dos protocolos utilizados nas diferentes fases da embriogênese somática. Seguem abaixo as conclusões obtidas:

- O 2,4-D ($175 \mu\text{mol L}^{-1}$) e PIC ($300 \mu\text{mol L}^{-1}$), foram eficientes para a formação de embriões somáticos a partir de embriões zigóticos de frutos imaturos de *E. edulis*.

- A combinação dos fitorreguladores 2-iP ($12,3 \mu\text{mol L}^{-1}$) e ANA ($0,6 \mu\text{mol L}^{-1}$) associados aos antioxidantes PVP (1 g L^{-1}), CA ($0,3$ e 3 g L^{-1}) ou sem a presença de antioxidantes no meio de maturação, com calos oriundos de meio de indução tratados com 2,4-D e picloram, foram satisfatórios na maturação de embriões somáticos de *E. edulis*.

- O meio contendo BAP e GA₃, sem pulsos auxínicos foram superiores na germinação de embriões somáticos de *E. edulis*.

8. RECOMENDAÇÕES

O Picloram se mostrou mais eficiente do que o 2,4-D, para a indução de calos e formação de embriões somáticos a partir de embriões zigóticos imaturos de *E. edulis*, sendo sugerida como a auxina mais responsiva e indicada para a indução da ES.

Sugere-se, com base nos resultados obtidos a partir de embriões zigóticos de frutos imaturos de *E. edulis*, testar concentrações mais elevadas (acima de $300 \mu\text{mol L}^{-1}$) de picloram, de modo a obter o ponto de máximo na concentração de picloram, para obtenção do número total de embriões somáticos.

Estudos relacionados à maturação e à conversão dos embriões somáticos deverão ser realizados para a melhoria do protocolo de regeneração, por meio de um pré-tratamento de maturação de modo a eliminar o efeito residual dos herbicidas auxínicos nesta fase.

Foi verificado que a germinação de embriões somáticos de *E. edulis*, foi evidenciada quando não utilizado pulsos auxínicos associados ao meio de germinação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, I. S., Carvalho, C. R., Clarindo, W. R. (2014) Massal induction of *Carica papaya* L. 'Golden' somatic embryos and somaclone screening by flow cytometry and cytogenetic analysis. *Cytologia*, 79 (3): 475-484.
- Ahée, J., Arthuis, P., Cas, G., Duval, Y., Guénin, G., Hanower, J., Hanower, P., Lievoux, D., Lioret, C., Malaurie, B., Pannetier, C., Raillot, D., Varechon, C., Zuckerman, L. (1981) La multiplication végétative *in vitro* du palmier à huile par embriogenèse somatique. *Oléagineux*, 36 (3): 113-117.
- Ahmad, I., Hussain, T., Ashraf, I., Nafees, M., Maryam, Rafay, M., Iqbal, M. (2013) Lethal effects of secondary metabolites on plant tissue culture. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 13 (4): 539-547.
- Alayón-Luaces, P., Ponce, N. M. A., Mroginski, L. A., Stortz, C. A., Sozzi, G. O. (2012) Compositional changes in cell wall polysaccharides from apple fruit callus cultures modulated by different plant growth regulators. *Plant Science*, 186 (1): 169-175.
- Amaral, A. L., Oliveira, P. R. D., Camargo, U. A., Czermainski, A. B. C. (2000) Eficiência da técnica de resgate de embriões na obtenção de híbridos entre cultivares apirênicas de videira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 22: 176-180.

- APG II. (2003) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 141 (4): 399-436.
- Aragão, A. K. O., Aloufa, M. A. I., Costa, I. D. A. (2011) Effect of BAP (6-benzylaminopurine) on shoot induction in explants of brazilwood. *Cerne*, 17 (3): 339- 345.
- Aragão, V. P. M., de Souza Ribeiro, Y. R., Reis, R. S., Macedo, A. F., Floh, E. I. S., Silveira, V., Santa-Catarina, C. (2016) *In vitro* organogenesis of *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae): the involvement of endogenous polyamines and carbohydrates on shoot development. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 124 (3): 611-620.
- Balzon, T. A., Luis, Z. G., Scherwinski-Pereira, J. E. (2013) New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49 (1): 41-50.
- Biasi, L. A., Carvalho, D. C., Andrade, A., Zanette, F. (1999) Estabelecimento *in vitro* do caquizeiro 'Fuyu' por meio de ápices meristemáticos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 21 (3): 279-283.
- Bonetti, K. A. P., Nesi, J., Quisen, R. C., Quoirin, M. (2016) Somatic embryogenesis from zygotic embryos and thin cell layers (TCLs) of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* × *Elaeis oleifera*). *African Journal of Biotechnology*, 15 (37): 2028- 2037.
- Bovi, M. L. A., Cardoso, M. (1975) Seed germination of *Euterpe edulis* Mart. *Bragantia*, 34: 29-34.
- Buffard-Morel, J., Verdeil, J. L., Pannetier, C. (1992) Embryogenèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) a partir d'explants foliaires: etudes histologiques. *Canadian Journal of Botany*, 70: 735-741.

- Caldas, L. S., Padmaja, H., Ferreira, M. E. (1998) Meios nutritivos. *In*: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. EMBRAPA-CNPq, p. 87-132.
- Campos, S. S., Scherwinski-Pereira, J. E., Bernd, R. B., Fior, C. S., Schwaz, S. F., (2020) Somatic embryogenesis as an alternative for *in vitro* multiplication of *Butia odorata* from mature zygotic embryos. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 92: 1-13.
- Carvalho, P. E. R. (2003) *Espécies arbóreas brasileiras*. EMBRAPA Informação Tecnológica; EMBRAPA Florestas, (Coleção Espécies Arbóreas Brasileiras), 1039 p.
- Carvalho, J. M. F. C., Lima, M. M. A., Aires, P. S. R., Vidal, M. S., Pimentel, N. W. (2006) *Embriogênese somática*. EMBRAPA Algodão, Documentos 152, 35 p.
- Carvalho, A. C. P. P., Pinheiro, M. V. M., Dias, G. M. G., Barros, L. M. (2011) *Estiolamento in vitro*: uma alternativa para a produção de mudas micropropagadas de antúrio. EMBRAPA Agroindústria Tropical, (Circular Técnica, 36), p. 1-8.
- Carvalho, C. S., Galetti, M., Colevatti, R. G., Jordano, P. (2016) Defaunation leads to microevolutionary changes in a tropical palm. *Scientific Reports*, 6 (1): 1-9.
- Castro, P. R. C., Vieira, E. L. (2001) *Aplicações de reguladores vegetais na agricultura tropical*. Livraria e Editora Agropecuária, 132 p.
- Chalupa, V. (1999) Somatic embryogenesis in linden (*Tilia* spp.). *In*: Jain, S. M., Gupta, P. K., Newton, R. J. (ed). *Somatic embryogenesis in woody plants*. *Kluwer Academic Publishers*, 5: 31-43.
- Chan, J. L., Saénz, L., Talavera, C., Robert, M., Oropeza, C. (1998) Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 17: 515-521.

- Cid, L. P. B. (2010) *Cultivo in vitro de plantas*. EMBRAPA Informação Tecnológica, 303 p.
- Clarindo, W. R., Carvalho, C. R., Araújo, F. S., Abreu, I. S., Otoni, W. C. (2008) Recovering polyploid papaya *in vitro* regenerants as screened by flow cytometry. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 92: 207-214.
- Córdova, A. M., Cobos, M., Imán, S. A., Castro, J. C. (2014) Un método eficiente para la inducción de callos *in vitro* en *Myrciaria dubia* (Kunth) Mc Vaugh "Camu Cultivar". *Scientia Agropecuaria*, 5 (1): 25-34.
- Correia, S. M., Canhoto, J. M. (2010) Characterization of somatic embryo attached structures in *Feijoa sellowiana* Berg. (Myrtaceae). *Protoplasma*, 242: 95-107.
- Costa, E. A. D., Gonçalves, C., Moreira, S., Corbellini, L. M. (2008) Produção de polpa e sementes de palmeira juçara: alternativa de renda para a Mata Atlântica. *Revista Tecnologia & Inovação Agropecuária*, 1 (2): 60-66.
- Cruz, C. D. (2016) Genes software - extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 38 (4): 547- 552.
- Dorneles, L. L., Zillikens, A., Steiner, J., Padilha, M. T. S. (2013) Biologia da polinização de *Euterpe edulis* Martius (Arecaceae) e associação com abelhas sociais (Apidae: Apini) em sistema de agroflorestal na ilha de Santa Catarina. *Iheringia*, 68 (1): 47-57.
- Droual, A. M., Hamdi, S., Creche, J., Kevers, C., Rideau, M. (1980) Autonomy to plant growth regulators and gene expression in Periwinkle culture '*in vitro*'. *Journal of Plant Physiology*, 153 (5/6): 623-630.
- Elhiti, M., Stasolla, C., Wang, A. (2013) Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49: 631- 642.
- Fantini, A. C., Ribeiro, R. J. Guries, R. P. (2000) Produção de palmito (*Euterpe*

edulis Martius - *Arecaceae*) na floresta ombrofila densa: potencial, problemas e possíveis soluções. *Sellowia*, 49 (52): 256-280.

Fantini, A. C., Ribeiro, R. J., Guries, R. P. (2004) Palmito (*Euterpe edulis* Martius, *Arecaceae*) na Mata Atlântica: um recurso em declínio. In: Alexiades, M. N.; Shanley, P. (eds.), *Productos forestales, medios de subsistencia y conservacio'n: estudios de caso sobre sistemas de manejo de productos forestales no maderables*. CIFOR, 141-161.

Fehér, A., Pasternak, T., Dudits, D. (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 74: 201-228.

Fehér, A. (2015) Somatic embryogenesis - Stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849:385-402.

Fki, L., Masmoudi, R., Drira, N. Rival. A. (2003) An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L., cv. Deglet Nour. *Plant Cell Reports*, 21: 517-524.

Floh, E. I. S., Dos Santos, A. L. W., Demarco, D. (2015) Embriogênese vegetal: abordagens básicas e biotecnológicas. In: Resende, R. R.; Soccol, C. R. (eds). *Biotecnologia Aplicada à Saúde*. Editora Edgard Blücher Ltda, 1 ed., 1: 1-15.

Francis, D., Sorrell, D. A. (2001) The interference between the cell cycle and plant growth regulators: a mini review. *Plant Growth Regulation*, 33: 1-12.

Freitas, E. O., Monteiro, T. R., Nogueira, G. F., Scherwinski-Pereira, J. E. (2016) Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos of the açai palm (*Euterpe oleracea*): Induction of embryogenic cultures, morphoanatomy and its morphological characteristics. *Scientia Horticulturae*, 212: 126-135.

Goh, D. K. S., Bon, M.-C., Aliotti, F., Escoute, J., Ferrière, N., Monteuis, O. (2001) *In vitro* somatic embryogenesis in two major rattan species: *Calamus merrillii*

and *Calamus subinermis*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37: 375-381.

Gomes, H. T., Bartos, P. M. C., Scherwinski-Pereira, J. E. (2017) Dynamics of morphological and anatomical changes in leaf tissues of an interspecific hybrid of oil palm during acquisition and development of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 131: 269-282.

Granja, Manuela M. C., Motoike, Sérgio Y., Andrade, Ana Paula S., Correa, Thais R., Picoli, Edgard A.T., Kuki, Kacilda Naomi. (2018) 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*, 117: 1-12.

Grattapaglia, D., Machado, M. A. (1998) Micropropagação. In: Torres, A. C., Caldas, L. S., Buso, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1: 43-76.

Gray, D. J., Compton, M. E., Harrell, R. C., Cantliffe, D. J. (1995) Somatic embryogenesis and the technology of synthetic seed. In: Bajaj, Y. P. S. (Ed.). *Biotechnology in agriculture and forestry: Somatic embryogenesis and synthetic seed*. Springer, 126-151.

Grossmann, K. (2010) Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. *Pest Management Science*, 66: 113–120.

Guerra, M. P., Handro, W. (1988) Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo cultures of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). *Plant Cell Reports*, 7: 550-552.

Guerra, M. P., Handro, W. (1998) Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae): control and structural features. *Journal of Plant Research*, 111: 65-71.

- Guerra, M. P., Torres, A. C., Teixeira, J. B. (1999) Embriogênese somática e sementes sintéticas. *In: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. SPI/EMBRAPA, 2: 533-568.
- Guerra, M. P., Nodari, R. O. (2006) *Introdução ao conceito de biotecnologia: apostila de biotecnologia 1: cultura de tecidos vegetal*. LFDGV, 41 p.
- Guimarães, L. A. O. P., Souza, R. G. (2017) *Palmeira juçara: Patrimônio Natural da Mata Atlântica no Espírito Santo*. INCAPER, 68 p.
- Henderson, A. (2000) The genus *Euterpe* in Brazil. *In: Reis, M. S., Reis, A. Euterpe edulis* Martius (palmitreiro) - biologia, conservação e manejo. Herbário Barbosa Rodrigues, 335 p.
- Heringer, A. S., Steinmacher, D. A., Fraga, H. P., Vieira, L. N., Montagna, T., Quinga, L. A., Guerra M. P. (2014) Improved high-efficiency protocol for somatic embryogenesis in peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) using RITA® temporary immersion system. *Scientia Horticulturae*, 179: 284-292.
- Huong, L. T. L., Baiocco, M., Huy, B. P., Mezzetti, B., Santilocchi, R., Rosati, P., (1999) Somatic embryogenesis in Canary Island date palm. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 56 (1): 1-7.
- Ihering, R. V. (1968) *Dicionário dos animais do Brasil*. Editora Universidade de Brasília. 790 p.
- Ikram-UI-Haq, Zafar, Y. (2004) Effect of nitrates on embryo induction efficiency in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *African Journal of Biotechnology*, 3 (6): 319-323.
- Jayanthi, M., Susanthi, B., Nandiganti, M. M., Mandal, P. K. (2015) *In vitro* somatic embryogenesis and plantlet regeneration from immature male inflorescence of adult dura and tenera palms of *Elaeis guineensis* (Jacq.). *SpringerPlus*, 4 (256): 1-7.

- Jeong, S. T., Goto-Yamamoto, N., Kobayashi, S., Esaka, M. (2004) Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Science*, 167: 247-252.
- Jiang, F., Feng, Z., Liu, H., Zhu, J. (2015) Involvement of plant stem cells or stem cell-like cells in dedifferentiation. *Frontiers in Plant Science*, 6 (1028): 1-6.
- Jiménez, V. M. (2001) Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13: 1-28.
- Jiménez, V. M. (2005) Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation*, 47: 91-110.
- Jones, A. M. P., Saxena, P. K. (2013) Inhibition of phenylpropanoid biosynthesis in *Artemisia annua* L.: a novel approach to reduce oxidative browning in plant tissue culture. *PLoS One*, 8 (10): 1-13.
- Kanchanapoom, K., Domyoas, P. (1999) The origin and development of embryoids in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) embryo culture. *Science Asia*, 25: 195-202.
- Karnovsky, M. J. (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 27: 137-138.
- Karun, A., Siril, E. A., Radha, E., Parthasarathy, V. A. (2004) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.). *Current Science*, 86 (12): 1623-1628.
- Kaur, P., Kothari, S. L. (2004) *In vitro* culture of kodo millet: influence of 2,4-D and picloram in combination with kinetin on callus initiation and regeneration. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 77: 73-79.
- Kayim, M., Koc, N. K. (2006) The effects of some carbohydrates on growth and

somatic embryogenesis in citrus callus culture. *Scientia Horticulturae*, 109: 29-34.

Konieczny, R., Sliwinska, E., Pilarska, M., Tuleja, M. (2012) Morphohistological and flow cytometric analyses of somatic embryogenesis in *Trifolium nigrescens* Viv. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 109: 131-141.

Kurczynska, E. U., Gaj, M. D., Ujczak, A., Mazur, E. (2007) Histological analysis of direct somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta*, 226: 619-628.

Lamas, F. M. (2001) Estudo comparativo entre cloreto de mepiquat e cloreto de aplicados no algodoeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 36 (2): 265-272.

Larcher, W. (2006) *Ecofisiologia Vegetal*. RIMA Artes e Textos, 532 p.

Ledo, A. S., Lameira, O. A., Benbadis, A. K., De Menezes, I. C., Oliveira, M. S. P., Medeiros Filho, S. (2002) Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Euterpe oleracea* Mart. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 24: 601-603.

Leitman, P., Judice, D. M., Barros, F. S. M., Prieto, P. V. (2013) Arecaceae. In: Martinelli, Gustavo; Moraes, Miguel Avila. *Livro Vermelho da Flora do Brasil*. Cncflora, p. 187-195.

Lima, C. P., Cunico, M. M., Miyazaki, C. M. S., Miguel, O. G., Côcco, L. C., Yamamoto, C. I., Miguel, M. D. (2012) Conteúdo polifenólico e atividade antioxidante dos frutos da palmeira juçara (*Euterpe edulis* Martius). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 14 (2): 321-326.

Little, E. L., Magbanua, Z. V., Parrott, W. A. (2000) A protocol for repetitive somatic embryogenesis from mature peanut epicotyls. *Plant Cell Reports*, 19: 351-357.

Liu, J., Sheng, L., Xu, Y., Li, J., Yang, Z., Huang, H., Xu, L. (2014) WOX11 and 12 WOX11 and 12 are involved in the first-step cell fate transition during de novo

root organogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 26 (3): 1081-1093.

Lopes, R., Oliveira, M. S. P., Cavallari, M. M., Barbieri, R. L., Conceição, L. D. H. C. S. (2015) *Palmeiras nativas do Brasil*. EMBRAPA, 432 p.

Lorenzi, H., Noblick, L., Kahn, F., Ferreira, E. (2010) *Flora brasileira-Arecaceae (palmeiras)*. Instituto Plantarum de Estudos da Flora. 368 p.

Loreti, E., Povero, G., Novi, G., Solfanelli, C., Alpi, A., Perata, P. (2008) Gibberellins, jasmonate and abscisic acid modulate the sucrose-induced expression of anthocyanin biosynthetic genes in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 179: 1004-1016.

Luis, Z. G., Scherwinski-Pereira, J. E. (2014) An improved protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from mature zygotic embryos. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 118: 485-496.

Maciel, S. D. A., Junior, F., Poeta, P. C., Silva, R. A. D., Scherwinski-Pereira, J. E. (2010) Morpho-anatomical characterization of embryogenic calluses from immature zygotic embryo of peach palm during somatic embryogenesis. *Acta Scientiarum Agronomy*, 32 (2): 263-267.

Machado, R. F., Barros, A. C. S. A., Zimmer, P. D., Amaral, A. S. (2006) Reflexos do mecanismo de ação de herbicidas na qualidade fisiológica de sementes e na atividade enzimática em plântulas de arroz. *Revista Brasileira de Sementes*, 28 (3): 151-160.

Marçal, T. S., Ferreira, A., Oliveira, W. B. S. O., Guilhen, J. H. S., Ferreira, M. F. S. (2015) Correlações genéticas e análise de trilha para caracteres de fruto da palmeira juçara. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 37 (3): 692-698.

Mazri, M. A., Belkoura, I., Meziani, R., Mokhless, B., Nour, S. (2017) Somatic embryogenesis from bud and leaf explants of date palm (*Phoenix dactylifera* L.)

cv. Najda. 3 *Biotech*, 7 (58): 1-9.

Meira, F. S., Luis, Z. G., Silva-Cardoso, I. M. A., Scherwinski-Pereira, J. E. (2020) Somatic embryogenesis from leaf tissues of macaw palm [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.]. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 92 (3):1-16.

Menezes, E. M. S., Torres, A. T., Srur, A. U. S. (2008) Valor nutricional da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) liofilizada. *Acta Amazônica*, 38 (2): 311-6.

Michaux-Ferrière, N., Grout, H., Carron, M. P. (1992) Origin and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae). *American Journal of Botany*, 79 (2): 174-180.

Ministério do Meio Ambiente – MMA. (2017) Disponível em: www.mma.gov.br/biodiversidade/especiesameacadasdeextincaoatualizacao-daslistas-de-especies-ameacadas. Acesso em: 09 de set. 2017.

Moreira, S. L. S., Prates Júnior, P., Fernandes, R. B. A., Cunha, A. C. M. M., Campos, A. N. R. (2016) Growth and nutrients uptake in *Euterpe edulis* Martius inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 46 (2): 169-176.

Mori, T., Sakurai, M., Seki, M., Furusaki, S. (1994) Use of auxin and cytokinin to regulate anthocyanin production and composition in suspension cultures of strawberry cell. *Journal of Food Science and Agriculture*, 65: 271-276.

Moura, E. F., Ventrella, M. C., Motoike, S. Y., Sá Jr., A. Q., Carvalho, M., Manfio, C. E. (2008) Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 95 (2): 175-184.

Moura, E. F., Motoike, S. Y., Ventrella, M. C., Sá Jr., A. Q., Ferreira, M. C., Carvalho, M. (2009) Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. *Scientia Horticulturae*, 119: 447-454.

- Moura, R. C., Lopes, P. S. N., Brandão Jr., D. S., Gomes, J. G., Pereira, M. B. (2010) Biometria de frutos e sementes de *Butia capitata* (Mart.) Beccari (Arecaceae), em vegetação natural no Norte de Minas Gerais, Brasil. *Biota Neotropica*. 10: 414-419.
- Murashige, T. M., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Namasivayam, P. (2007) Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 90: 1-8.
- Naz, S., Ali, A., Iqbal, J. (2008) Phenolic content *in vitro* cultures of chick pea (*Cicer arietinum* L.) during callogenesis and organogenesis. *Pakistan Journal of Botany*, 40 (6): 2525-2539.
- Nodari, R. O., Reis, M. S., Guerra, M. P. (2000) Conservação do palmitreiro (*Euterpe edulis* Martius). In: Reis, M. S.; Reis, A. *Euterpe edulis* Martius (palmitreiro) - biologia, conservação e manejo. Herbário Barbosa Rodrigues. 335 p.
- Nuño-Ayala, A., Rodríguez-Garay, B., Gutiérrez-Mora, A. (2012) Somatic embryogenesis in *Jarilla heterophylla* (Caricaceae). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 109: 33-39.
- O'Brien, T. P., McCully, M. E. (1981) The study of plant structure principles and selected methods. *Termarcarphi Pty*, 1: 352 p.
- Oliveira, E. J., Koehler, A. D., Rocha, D. I., Vieira, L. M., Pinheiro, M. V. M., Matos, E. M., Cruz, A. N. F., Silva, T. C. R., Tanaka, F. A. O., Nogueira, F. T. S., Otoni, W. C. (2017) Morpho-histological, histochemical, and molecular evidences related to cellular reprogramming during somatic embryogenesis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Protoplasma*, 254 (5): 1-18.
- Oliveira Jr.; R. S. (2011) Mecanismo de ação de herbicidas. In: Oliveira Jr., R. S.,

Constantin, J., Inoue, M. H. *Biologia e manejo de plantas daninhas*. Editora Omnipax, p.141-192.

Othmani, A., Bayoudh, C., Drira, N., Marrakchi, M., Trifi M. (2009) Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm *Phoenix dactylifera* L., cv. Boufeggous is significantly improved by fine chopping and partial desiccation of embryogenic callus. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 97: 71-79.

Padilha, J. H. D., Ribas, L. L. F., Amano, E., Quoirin, M. (2015) Somatic embryogenesis in *Acrocomia aculeata* Jacq. (Lodd.) ex Mart using the thin cell layer technique. *Acta Botanica Brasílica*, 29 (4): 516-523.

Pádua, M. P., Paiva, L. V., Labory, C. R. G., Alves, E., Stein, V. C. (2013) Indução e caracterização de massas pró-embriogênicas de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 85 (4): 1545-1556.

Pádua, M. S., Santos, R. S., Labory, C. R. G., Stein, V. C., Mendonça, E. G., Alves, E., Paiva, L. V. (2017) Histodifferentiation of oil palm somatic embryo development at low auxin concentration. *Protoplasma*, 255 (1): 1-11.

Panza, V., Distéfano, A. J., Carjuzaa, P., Láinez, V., Del Vas, M., Maldonado, S. (2007) Detection of dehydrin-like proteins in embryos and endosperm of mature *Euterpe edulis* seeds. *Protoplasma*, 231 (1/2): 1-5.

Pelegri, L. L., Ribas, L. L. F., Amano, E., Quoirin, M. (2013) Somatic embryogenesis and morphoanatomy of *Ocotea porosa* somatic embryos. *Ciência Florestal*, 23 (4): 595-605.

Peña-Ramírez, Y. J., Juárez-Gómez, J., Gómez-López, L., Jerónimo-Pérez, J. L., García-Sheseña, I., González-Rodríguez, J. A., Robert, M. L. (2010) Multiple adventitious shoot formation in Spanish Red Cedar (*Cedrela odorata* L.) cultured *in vitro* using juvenile and mature tissues: an improved

micropropagation protocol for a highly valuable tropical tree species. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 46 (2): 149-160.

Perán-Quesada, R., Sancez-Romero, C., Barceló, A., Pliegoalfaro, F. (2004) Factors affecting maturation of avocado somatic embryos. *Scientia Horticulture*, 102: 61-73.

Pérez-Núñez, M. T., Chan, J. L., Sáenz, L., González, T., Verdeil, J. L., Oropeza, C. (2006) Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) plumule explants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 42: 37-43.

Petri, J. L., Haverroth, F. J., Leite, G. B., Sezerino, A. A., Couto, M. (2016) *Reguladores de crescimento para frutíferas de clima temperado*. EPAGRI, 141 p.

Pilarska, M., Malec, P., Salaj, J., Bartnicki, F., Konieczny, R. (2016) High expression of Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase coincides with initiation of various developmental pathways in *in vitro* culture of *Trifolium nigrescens*. *Protoplasma*, 253 (2): 345-55.

Pinhal, H. F., Anastácio, M., Carneiro, P., Silva, V., Morais, T., Luz, J. (2011) Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do cerrado. *Ciência Rural*, 41 (7): 1136-1142.

Pinheiro, M. V. M., Silva, T. C. R., Maia, C., Lima, B. V., Motoike, S. Y. (2012) Propagação *in vitro* de genótipos de alface via embriogênese somática. *Ciência Rural*, 42: 1947-1953.

Pinheiro, M. V. M., Martins, F. B., Xavier, A., Otoni, W. C. (2013) Trocas gasosas influenciam na morfogênese *in vitro* de duas cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.). *Revista Árvore*, 37 (1): 1-12.

Pinto, G., Silva, S., Park, Y.S., Neves, L., Araújo, C., Santos, C. (2008) Factors influencing somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globulus* Labill:

basal medium and anti-browning agents. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 95 (1): 79-88.

Pinto, G., Silva, S., Loureiro, J., Costa, A., Celeste, M., Conceição, N., Arau, C. (2011) Acclimatization of secondary somatic embryos derived plants of *Eucalyptus globulus* Labill: an ultrastructural approach. *Trees - Structure and Function*, 25: 383-392.

Pio Corrêa, M. (1969) *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Ministério da Agricultura, 4: 543.

Raemakers, C. J. J., Jacobsen, E., Visser, R. G. F. (1995) Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. *Euphytica*, 81: 93-107.

Raven, P. H., Evert, R. F., Eichhorn, S. E. (2007) *Biologia Vegetal*. Editora Guanabara Koogan, 7 ed. 856 p.

Ree, J. F., Guerra, M. P. (2015) Palm (*Arecaceae*) somatic embryogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 51 (6): 589-602.

Reis, M. S., Guimarães, E., Oliveira, G. P. (1993) Estudos preliminares da biologia reprodutiva do palmitreiro (*Euterpe edulis*) em mata residual do Estado de São Paulo. *In*. Congresso Florestal Brasileiro, *Anais*, EMBRAPA, p. 358-360.

Reis, A., Kageyama, P. Y. (2000) Dispersão de sementes de *Euterpe edulis* Martius Palmae. *Sellowia*, 49 (52): 60-92.

Reitz, R., Klein, R. M., Reis, A. (1988) *Projeto Madeira do Rio Grande do Sul*. Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado do Rio Grande do Sul. 524 p.

Rocha, D. I., Kurczyńska, E., Potocka, I., Steinmacher, D. A., Otoni, W. C. (2016) Histology and Histochemistry of Somatic Embryogenesis. *In*: Loyola-Vargas, V. M.; Ochoa-Alejo, N. (eds.). *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and*

Applications. Springer, p. 471-494.

- Sáenz, L., Azpeitia, A., Chuc-Armendariz, B., Chan, J. L., Verdeil J. L., Hocher, V., Oropeza, C. (2006) Morphological and histological changes during somatic embryo formation from coconut plumule explants. *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant*, 42: 19-25.
- Sáenz, L., Herrera-Herrera, G., Uicab-Ballote, F., Chan, J. L., Oropeza, C. (2010) Influence of form of activated charcoal on embryogenic callus formation in coconut (*Cocos nucifera*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 100: 301-308.
- Saldanha, C. W., Martins-Corder, M. P., Steinmacher, D. A., Guerra, M. P. (2006) *In vitro* morphogenesis in zygotic embryos and leaf sheaths of *Euterpe edulis* Martius (Arecaceae). *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 6: 228-235.
- Saldanha, C. W., Martins-Corder, M. P. (2012) *In vitro* germination and embryogenic competence acquisition of *Euterpe edulis* Martius immature zygotic embryos. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 12 (3): 171-178.
- Sané, D., Aberlenc-Bertossi, F., Gassama-Dia, Y. K., Sagna, M., Trouslot, M. F., Duval, Y., Borgel, A. (2006) Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). *Annals of Botany*, 98: 301-308.
- Santa-Catarina, C., Maciel, S. D. C., Pedrotti, E. L. (2001) *In vitro* germination and somatic embryogenesis from immature embryos of "canela sassafrás" (*Ocotea odorifera* Mez). *Revista Brasileira de Botânica*, 24 (4): 501-510.
- Scherwinski-Pereira, J. E., Guedes, R. S., Fermino Jr., P. C. P., Silva, T. L., Costa, F. H. S. (2010) Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 46: 378-385.
- Scherwinski-Pereira, J. E., Guedes, R. S., Silva, R. A., Fermino Jr., P. C. P., Luis,

- Z. G., Freitas, E. O. (2012) Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 109: 501-508.
- Schulz, M., da Silva C. B., G., Gonzaga, L. V., Oliveira Costa, A. C., Fett, R. (2016) Juçara fruit (*Euterpe edulis* Mart.): Sustainable exploitation of a source of bioactive compounds. *Food Research International*, 89: 14-26.
- Schwendiman, J., Pannetier, C., Michaux-Ferriere, N. (1988) Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm *Elaeis guineensis*. *Annals of Botany*, 62: 43-52.
- Scudeller, V. V., Martins, F. R., Sheperd, G. J. (2001) Distribution and abundance of arboreal species in the Atlantic ombrophilous dense forest in Southeastern Brazil. *Plant Ecology*, 152: 185-199.
- Sharma, D. R., Dawra S., Choudhury J. B. (1984) Somatic embriogenesis and plant regeneration in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Khadravi through tissue culture. *Indian Journal Experimental of Biology*, 22: 596-598.
- Sharp, W. R., Sondahl, M., Caldas, L. S., Maraffa, S. B. (1980) The physiology on *in vitro* assexual embryogenesis. *Horticultural Review*, 2: 268-310.
- Sharry, S., Cabrera-Ponce, J. L., Herrera-Estrella, L., Rangel-Cano, R. M., Lede, S.; Abedini, W. (2006) An alternative pathway for plant *in vitro* regeneration of chinaberry –tree *Melia azedarach* L. derived from the induction of somatic embryogenesis. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9: 187-194.
- Sick, H. (1984) *Ornitologia brasileira, uma introdução*. Editora UNB-Linha Gráfica Editora. 1: 481p.
- Silva, I. S., Santana, A. C., Reis, M. S. (2006) Análise dos retornos sociais oriundos de adoção tecnológica na cultura do açai no Estado do Pará. *Ciência & Desenvolvimento*, 2 (3): 25-37.

- Silva, A. A., Ferreira, F. A., Ferreira, L. R. (2007) Herbicidas: classificação e mecanismo de ação. *In: Silva, A. A.; Silva, J. F. (eds). Tópicos em manejo de plantas daninhas. Editora UFV, p. 83-148.*
- Silva, R. C., Luis, Z. L., Scherwinski-Pereira, J. E. (2012) Differential responses to somatic embryogenesis of different genotypes of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 11: 59-67.
- Silva, G. M., Cruz, A. C. F., Otoni, W. C., Pereira, T. N. S., Rocha, D. I., Silva, M. L. (2015) Histochemical evaluation of induction of somatic embryogenesis in *Passiflora edulis* Sims (*Passifloraceae*). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 51 (5): 539-545.
- Silva, A. R., Silveira, R. R., Aumond, A., Silveira, A. B., Cademartori, C. V. (2017) Frugivoria e dispersão de sementes de *Euterpe edulis* Mart. (Arecacea) por mamíferos e aves silvestres na Mata Atlântica do Sul do Brasil. *Revista Brasileira de Zootecias*, 18 (3): 138–158.
- Silva-Cardoso, I. M. A., Meira, F. S., Gomes, A. C. M. M., Scherwinski-Pereira, J. E. (2019) Anatomical and histochemical studies of the somatic embryogenesis of *Syagrus oleracea* from immature inflorescences. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 19 (4): 444-450.
- Simões, C., Albarello, N., Callado, C. H., Castro, T. C., Mansur, E. (2010) Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Cleome rosea* Vahl. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53: 679-686.
- Siqueira, E. R., Inoue, M. T. (1991) Controle de oxidação na cultura de tecidos do coqueiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 26 (7): 949-953.
- Skoog, F., Miller, C. O. (1957) *Chemical regulation of growth and organ formation plant tissues culture in vitro*. Society for Experimental Biology, 11: 118-140.
- Soares, J. J. (1999) Fitorreguladores e remoção da gema apical no

desenvolvimento do algodoeiro. *Scientia Agricola*, 56 (3): 627-630.

Souza, C. M., Pinto J. E. B. P., Rodrigues, B. M., Morais, A. R., Arrigoniblanck, M. F. (1999) Influência dos fatores físicos na regeneração de brotos em repolho. *Ciência e Agrotecnologia*, 23 (4): 830-835.

Steinmacher, D. A., Cangahuala-Inocente, G. C., Clement, C. R., Guerra, M. P. (2007a) Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. *In Vitro Cellular Development Biology-Plant*, 43 (2): 124-132.

Steinmacher, D. A., Clement, C. R., Guerra, M. P. (2007b) Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 89 (1): 15-22.

Steinmacher, D. A., Krohn, N. G., Dantas, A. C. M., Stefenon, V. M., Clement, C. R.; Guerra, M. P. (2007c) Somatic embryogenesis in peach palm using the Thin Cell Layer Technique: Induction, morpho-histological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation. *Annals of Botany*, 100 (4): 699-709.

Steinmacher, D. A., Guerra, M. P., Saare-Surminski, K., Lieberei, R. (2011) A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. *Annals of Botany*, 108 (8): 1463-1475.

Sugimura, Y., Salvana, M. J. (1989) Induction and growth of callus derived from rachilla explants of young inflorescences of coconut palm. *Canadian Journal of Botany*, 67 (1): 272-74.

Sun, D-Q., Lu, X-H., Liang, G-L., Guo, Q-G., Mo, Y-W., Xie, J-H. (2011) Production of triploid plants of papaya by endosperm culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 104 (1): 23-29.

Taiz, L., Zeiger, E. (2017) *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. Artmed, 6 ed., 858 p.

- Teixeira, J. B., Söndahl, M. R., Kirby, E. G. (1993) Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 34: 227-233.
- Teixeira, J. B., Söndahl, M. R., Kirby, E. G. (1994) Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. *Plant Cell Reports*, 13: 247-250.
- Teixeira, J. B., Söndahl, M. R., Nakamura, T., Kirby, E. G. (1995) Establishment of oil palm cell suspensions and plant regeneration. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 40: 105-111.
- Teixeira, L. N., Stringheta, P. C., Oliveira, F. A. (2008) Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. *Revista Ceres*, 55 (4): 297-304.
- Teixeira, L. R., Braccini, A. L., Churata, B. G. M., Vieira, E. S. N., Martins, P. K., Schuster, I. (2011) Evaluation of soybean cultivars on the embryogenic and organogenic potential. *Acta Scientiarum Agronomy*, 33 (1): 67-74.
- Thorpe, T. A. (1994) Morphogenesis and regeneration. In: Vasil, K. I., Thorpe, T. A. *Plant cell and tissue culture*. Kluwer Academic, p.17-36.
- Thuzar, M., Vanavichit, A., Tragoonrung, S., Jantasuriyarat, C. (2012) Recloning of regenerated plantlets from elite oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) cv. Tenera. *African Journal of Biotechnology*, 11: 14761-14770.
- Torres, A. C., Barbosa, N. V. R., Willadino, L., Guerra, M. P., Ferreira, C. F., Paiva, S. A. V. (2001) *Meio e condições de incubação para cultura de tecidos de plantas: formulações de meios para a cultura de tecidos de plantas*. EMBRAPA Hortaliças, (Circular Técnica, 24), 20 p.
- Valverde, R., Arias, O., Thorpe, T. A. (1987) Picloram-induced somatic embryogenesis in pejobaye palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 10 (2): 149-156.

- Vasil, I. K. (2008) A brief history of plant biotechnology: from the cell theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Reports*, 27: 1423-1440.
- Verdeil, J. L., Huet, C., Grosdemange, F., Buffard-Morel, J. (1994) Plant regeneration from cultured immature inflorescences coconut (*Cocos nucifera* L.): Evidence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 13: 218-221.
- Verdeil, J. L., Hocher, V., Huet, C., Grosdemange, F., Escoute, J., Ferriere, N., Nicole, M. (2001) Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence. *Annals of Botany*, 88: 9-18.
- Villa, F., Pasqual, M., Souza, A. G., Vilela, X. M. S. (2010) Meios de cultura e reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta. *Scientia Agraria*, 11 (2): 109-117.
- Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., Filonova, L. (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 69: 233-249.
- Wang, H. C., Chen, J. T., Chang, W. C. (2006) Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf, root and stem-derived callus cultures of *Areca catechu*. *Biologia Plantarum*, 50: 279-282.
- Yusnita, Hapsoro, D. (2011) *In vitro* callus induction and embryogenesis of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from leaf explants. *Hayati Journal of Biosciences*, 18 (2): 61-65.
- Zavattieri, M. A., Frederico, A. M., Lima, M., Sabino, R., Arnholdt-Schmitt, B. (2010) Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13 (1): 1-9.
- Zegzouti, R., Arnould, M.F., Favre, J.M. (2001) Histological investigation of the multiplication step in secondary somatic embryogenesis of *Quercus robur* L. *Annals of Forest Science*, 58: 681-690.