

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FLORESTAIS E DA MADEIRA

JOÃO PEDRO VIEIRA FRAGA DE ASSIS

TRICLOPIR COMO INDUTOR EMBRIOGÊNICO EM SEGMENTOS DE
CAULÍCULO DE *Euterpe edulis* Martius

JERÔNIMO MONTEIRO
ESPÍRITO SANTO
2024

JOÃO PEDRO VIEIRA FRAGA DE ASSIS

TRICLOPIR COMO INDUTOR EMBRIOGÊNICO EM SEGMENTOS DE
CAULÍCULO DE *Euterpe edulis* Martius

Monografia apresentada ao Departamento de Ciências Florestais e da Madeira da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Engenheiro Florestal.

Orientador: D. Sc. Rodrigo Sobreira Alexandre
Conselheira: Dr^a. Tamyris de Mello

JERÔNIMO MONTEIRO

ESPÍRITO SANTO

2024

JOÃO PEDRO VIEIRA FRAGA DE ASSIS

TRICLOPIR COMO INDUTOR EMBRIOGÊNICO EM SEGMENTOS DE
CAULÍCULO DE *Euterpe edulis* Martius

Monografia apresentada ao Departamento de Ciências Florestais e da Madeira da
Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do
título de Engenheiro Florestal.

Aprovado em 03 de julho de 2024.

COMISSÃO EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 RODRIGO SOBREIRA ALEXANDRE
Data: 22/07/2024 10:04:38-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

D. Sc. Rodrigo Sobreira Alexandre
(Orientador)

Documento assinado digitalmente
 TAMYRIS DE MELLO
Data: 18/07/2024 18:17:30-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr^a. Tamyris de Mello
Universidade Federal do Espírito Santo
(Examinador)

Documento assinado digitalmente
 INGRIDH MEDEIROS SIMÕES
Data: 20/07/2024 10:03:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

M^a. Sc. Ingridh Medeiros Simões
Universidade Federal do Espírito Santo
(Examinador)

Ao meu pai, José Vieira Fraga Filho.
(In memoriam)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me conceder forças, sabedoria e discernimento ao longo da jornada acadêmica. Sua presença em minha vida foi fundamental para alcançar essa conquista.

A minha mãe, Emília Maria de Assis pelo amor incondicional, pelo suporte constante e por acreditar em mim mesmo nos momentos mais desafiadores. Sua dedicação e sacrifícios foram essenciais para que eu pudesse chegar até aqui.

Às minhas irmãs, Sarah, Raíssa e Áurea, por serem minha base, por me cultivarem e por estarem sempre ao meu lado, compartilhando alegrias e tristezas. A união e o carinho de vocês me motivaram a seguir em frente.

Ao meu professor e orientador, D. Sc. Rodrigo Sobreira Alexandre, pela paciência, orientação e dedicação ao longo deste trabalho e de minha jornada acadêmica. Sua sabedoria e experiência foram cruciais para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos demais professores, Elzimar Gonçalves de Oliveira, Gilson Fernandes da Silva, Henrique Machado Dias e Nilton Cesar Fiedler, pelo conhecimento transmitido e pelo apoio durante a graduação. Suas aulas e conselhos foram fundamentais para minha formação acadêmica.

Aos meus amigos de graduação, Beatriz Mauri, Caroline Carvalho, Gustavo Jaske, Jéssica Terra e Thiago Martins, pela amizade, companheirismo e por tornarem essa caminhada mais leve e divertida. Os momentos compartilhados com vocês foram inesquecíveis. Juntos, enfrentamos muitos desafios e crescemos como profissionais e como pessoas.

Aos demais amigos, André Boone, Bruno Della, Eduardo Cade, Eduardo Neiva, Emanuel Bizareli, Heitor Mendes, Hudson Maia, Igor Pena e Raul Jacobem, pelo apoio e pela amizade ao longo desses anos. A presença de vocês fez toda a diferença na minha trajetória.

A toda equipe do Laboratório de Sementes Florestais e Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, em especial a Ingridh Medeiros Simões e Tamiris de Mello, por aceitarem compor a banca de avaliação e por suas contribuições valiosas para a conclusão deste trabalho.

À turma 2019/1 do curso de Engenharia Florestal, pela convivência, pelas experiências compartilhadas e pelo apoio mútuo durante essa jornada acadêmica.

À Universidade Federal do Espírito Santo e ao Departamento de Ciências Florestais e da Madeira, por proporcionarem um ambiente de aprendizado e crescimento, por oferecerem recursos e oportunidades que foram essenciais para minha formação.

A todos que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos. Sem o apoio de vocês, nada disso seria possível.

Obrigado!

RESUMO

Euterpe edulis Martius, conhecida como palmeira juçara, é uma espécie nativa da Mata Atlântica reconhecida pela produção do palmito doce e frutos de alto valor nutricional. Os frutos são ricos em antocianinas e compostos fenólicos, que possuem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e cardioprotetoras. Devido à exploração para extração de palmito, que resulta na morte da planta, a espécie *E. edulis* encontra-se vulnerável à extinção. A embriogênese somática tem emergido como uma alternativa eficiente para a propagação de palmeiras, embora ainda pouco explorada comercialmente. Diante do exposto, objetivou-se com o trabalho analisar a indução da embriogênese somática com o uso de diferentes concentrações de triclopir, hipotetizando se o herbicida auxínico é capaz de promover a formação de calos e embriões somáticos em segmentos de caulículo de *E. edulis*. As sementes foram coletadas em estágio de maturação incompleta, com aproximadamente 180 dias após a antese, no município de Pedra Menina - ES, em seguida, encaminhadas para o laboratório, desinfestadas e estabelecidas *in vitro*, e mantidas no escuro por 180 dias. Após o período, plântulas de juçara foram divididas em segmentos cilíndricos, seccionados longitudinalmente e colocados com o ferimento para cima em placas de Petri contendo triclopir em diferentes concentrações (20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, ou 160 μM). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com oito concentrações de triclopir, contendo 20 repetições, contendo seis explantes em cada placa. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste Tukey ($p > 0,05$). As concentrações de 20 e 40 μM de triclopir foram eficazes na indução de calos embriogênicos em *E. edulis*, alcançando percentuais de 58% e 54%, respectivamente. Na fase de pré-maturação, os segmentos de cálculo provenientes da indução embriogênica com concentração de 20 μM mostraram maior viabilidade, com 87% dos explantes viáveis e taxa de oxidação nula. O triclopir apresenta potencial para a propagação *in vitro*, via embriogênese somática.

Palavras-chave: Juçara. Embriogênese somática. Cultura de tecidos vegetais. Herbicida auxínico.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	11
2.1 Objetivos gerais	11
2.2 Objetivos específicos	11
3. REFERENCIAL TEÓRICO	12
3.1 <i>Euterpe edulis</i> Martius	12
3.2 Cultura de tecidos vegetais e embriogênese somática	14
3.3 Indução	16
4. METODOLOGIA	20
4.1 Indução	20
4.2 Pré-maturação	21
5. RESULTADOS	22
5.1 Indução	22
5.2 Pré-maturação	25
6. DISCUSSÕES	29
6.1 Indução	29
6.2 Pré-maturação	34
7. CONCLUSÃO	36
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Calogênese (%) de explantes de *E. edulis* em diferentes concentrações de triclopir. ¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). 24
- Figura 2 - Oxidação (%) de explantes de *E. edulis* em diferentes concentrações de triclopir. ¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). 25
- Figura 3 - Explantes vivos não calejados (%) de *E. edulis* em diferentes concentrações de triclopir. ¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). 25
- Figura 4 - Número médio de pró-embriões formados em explantes de *E. edulis* em diferentes concentrações de triclopir. ¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). 26
- Figura 5 - Morfologia de calos e embriões somáticos obtidos durante a indução embriogênica de *E. edulis*, a partir de segmentos de caulículo, em meio de cultura suplementado com 20 μ M de triclopir. (A) Explante não oxidado e sem a presença de calos. (B) Explante totalmente oxidado. (C) Explante com a presença de calos. (D) Explante calejado com a presença de embriões somáticos. (E) Embriões somáticos. Barra: 1 mm. 27
- Figura 6 - Viabilidade de explantes (%) de *E. edulis* após o período de pré-maturação em meio de cultura basal. ¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). 27
- Figura 7 - Oxidação (%) de explantes de *E. edulis* após o período de pré-maturação em meio de cultura basal. ¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). 28
- Figura 8 - Número médio de pró-embriões formados em explantes de *E. edulis* após o período de pré-maturação em meio de cultura basal. ¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). 29
- Figura 9 - Morfologia de embriões somáticos após o processo de pré-maturação de calos embriogênicos de *E. edulis*, a partir de segmentos de caulículo, em meio de cultura basal. (A; B) Calos e embriões somáticos. (C; D) Embriões somáticos. Barra: 1 mm. 30

1. INTRODUÇÃO

Euterpe edulis Martius, uma palmeira da família Arecaceae, é nativa da Mata Atlântica e amplamente conhecida pela produção de palmito doce, considerado um alimento gourmet exótico e de grande valor econômico. A espécie apresenta uma *superfruta* com importantes características químicas, incluindo alto teor de antocianinas (634,26 a 2.929 mg de cianidina-3-glicosídeo por 100 g) e compostos fenólicos totais (415,1 a 9.778,20 mg equivalentes de ácido gálico por 100 g) (PEREIRA et al., 2022).

Seu fruto apresenta características sensoriais semelhantes às do açaí (*Euterpe oleracea* Martius), mas com uma composição nutricional mais elevada, destacando-se pelos seus efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e cardioprotetores (SCHULZ et al., 2016; CARDOSO et al., 2018). Isso reduz a pressão antrópica sobre o palmito e, de maneira sustentável, incentiva a cadeia produtiva de polpa (SILVA et al., 2006). O uso desta palmeira para a extração do palmito resulta na morte da planta, pois é monocaule e não possui a capacidade de perfilhar, o que a coloca na lista de espécies ameaçadas de extinção (WENDT et al., 2011; SCHULZ et al., 2016). Nesse contexto, a exploração indiscriminada representa uma ameaça à sustentabilidade das populações naturais de *E. edulis* (REIS; KAGEYAMA, 2000).

A espécie *E. edulis* é uma palmeira que se propaga exclusivamente por sementes, que são recalcitrantes, perdendo rapidamente seu vigor após a colheita e apresentando uma germinação lenta e desigual (CURSI; CICERO, 2014; SCHULZ et al., 2016). Devido a essas características, a regeneração natural da planta, que ocorre apenas por sementes, é dificultada pela necessidade de fecundação cruzada, resultando em alta variabilidade genética da espécie (DORNELES et al., 2013).

O processo de embriogênese somática tem se tornado uma alternativa eficiente para a propagação de palmeiras (MOURA et al., 2008). Para *E. edulis*, a propagação vegetativa *in vitro* é uma ferramenta de grande importância, embora pouco utilizada em escala comercial. Em ambientes restritos, a embriogênese somática tem se mostrado uma técnica promissora e eficaz para várias espécies de palmeiras (REE; GUERRA, 2015).

A embriogênese somática de palmeiras, em geral, depende da exposição de células ou tecidos de diversos explantes, como embriões zigóticos, inflorescências, ápices caulinares e bainhas foliares, sob condições controladas *in vitro* e

concentrações específicas de sais minerais, compostos orgânicos (FEHER et al., 2003; ZAVATTIERI et al., 2010) e fitorreguladores, como auxinas e citocininas (JIMENEZ, 2005; ELHITI et al., 2013).

Devido a isso, essa técnica vem se mostrando uma ferramenta promissora para a conservação e propagação de espécies, contudo, vários fatores, incluindo reguladores de crescimento, condições gerais de cultura e explantes utilizados, podem afetar significativamente durante todo o processo de propagação *in vitro* da espécie (CARVALHO, 2013).

A indução da embriogênese somática de *E. edulis* é um processo crítico de reprogramação de células somáticas em células embrionárias, que influenciam diretamente no sucesso da regeneração das plântulas *in vitro*, gerando uma compreensão aprofundada, que é fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias de propagação e conservação (SIMÕES et al., 2012).

Estudos recentes indicam que a utilização de auxinas, como o ácido indol-3-butírico (AIB), e citocininas, como a 6-benzilaminopurina (BAP), são cruciais para a indução e maturação de embriões somáticos em palmeiras (PAIVA NETO et al., 2018). Além disso, o ajuste de fatores físicos, como a luminosidade e temperatura, também desempenha um papel vital no sucesso do cultivo *in vitro* (SILVEIRA et al., 2013).

Na indução da embriogênese somática, é comum a utilização de reguladores de crescimento específicos, como os análogos de auxinas. Entre eles, destacam-se o ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram) e seu análogo ácido 3,5,6-tricloro-2-piridiniloxiacético (triclopir), ambos demonstrando resultados promissores em *E. edulis* (MELLO et al., 2024a). Além desses, o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é um outro regulador que apresentou sucesso na indução em *E. edulis* (GUERRA; HANDRO, 1998), diferente do ácido 4-clorofenoxiacético (4-CPA), pertencente ao mesmo grupo do 2,4-D, que possuem poucos relatos de uso na embriogênese somática de *E. edulis*, representando uma possível área de investigação futura (ALMEIDA, 2024).

O triclopir é uma herbicida auxinico capaz de promover a formação de calos e embriões somáticos em diferentes explantes de *E. edulis* (MELLO et al, 2024a). Estudos anteriores utilizaram o triclopir de forma isolada e associado a outros fitorreguladores e aminoácidos a fim de analisar seus efeitos em diferentes

contextos, resultando em embriões zigóticos de *E. edulis* com alto percentual de calejamento e taxa de oxidação nula (CADE, 2023).

A aplicação do triclopir tem demonstrado uma eficácia significativa na indução de respostas morfogenéticas para *E. edulis*, como a formação de calos e embriões somáticos, destacando-se como uma ferramenta promissora para estudos de biotecnologia vegetal e melhoramento genético (MELLO et al., 2024b).

Dessa forma, a embriogênese somática não apenas contribui para a preservação genética e o manejo sustentável de *E. edulis*, mas também promove a recuperação de populações naturais e a redução da pressão sobre a extração de palmito, assegurando a sustentabilidade econômica e ambiental da espécie (SCHULZ et al., 2016; PAIVA NETO et al., 2018).

Diante do exposto, objetivou-se com o trabalho analisar a indução da embriogênese somática com o uso de diferentes concentrações de triclopir, hipotetizando se o herbicida auxínico é capaz de promover a formação de calos e embriões somáticos em segmentos de caulículo de *E. edulis*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Analisar o processo de indução na embriogênese somática de segmentos de caulículo de *E. edulis* com o uso de diferentes concentrações de triclopir.

2.2 Objetivos específicos

Identificar a concentração de triclopir que resulte em maior formação de calos e baixa taxa de oxidação durante o processo de indução embriogênica em segmentos de caulículo de *E. edulis*.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 *Euterpe edulis* Martius

A família Arecaceae é considerada um dos grupos de plantas tropicais mais fascinantes e significativas, composta por cerca de 3.000 espécies distribuídas em cinco subfamílias, predominantemente composta por palmeiras, que de maneira geral, possuem um alto valor econômico e etnobotânico devido à sua importância cultural e à vasta gama de produtos que podem ser extraídos a partir delas (SOUZA; LIMA, 2019).

Euterpe edulis Martius é uma palmeira da família Arecaceae, nativa da Mata Atlântica, amplamente reconhecida pela produção de palmito doce, um alimento gourmet exótico e de alto valor comercial. Esta espécie apresenta uma *superfruta* com propriedades químicas notáveis, incluindo um alto teor de antocianinas (634,26 a 2.929 mg de cianidina-3-glicosídeo por 100 g) e compostos fenólicos totais (415,1 a 9.778,20 mg equivalentes de ácido gálico por 100 g) (PEREIRA et al., 2022).

Apresenta um estipe vertical, cilíndrico e relativamente fino, atingindo uma altura de aproximadamente 10 a 20 metros e um diâmetro de 8 a 20 centímetros à altura do peito. Suas folhas são dispostas de forma alternada e pinadas, medindo cerca de 2 a 2,5 metros de comprimento. As bainhas são verdes e bem desenvolvidas, entrelaçando-se no topo do estipe por sobreposição, criando uma configuração distinta no ápice onde se localiza o palmito (REIS et al., 2000). As raízes, ao atingirem a fase adulta, se estendem lateralmente até 6 metros de comprimento e penetram até 1,5 metros de profundidade (BOVI et al., 1992).

Esta espécie é caracterizada como alógama, apresentando flores unissexuais de coloração branco-amarelada, organizadas em tríades, com duas flores masculinas e uma feminina (BOVI; CARDOSO, 1978; COELHO, 2010). A polinização cruzada ocorre através do mecanismo de protandria, onde a maturação das anteras (estruturas masculinas) antecede a receptividade dos estigmas (componentes femininos) (BORÉM; MIRANDA, 2013).

A propagação seminífera da espécie apresenta desafios, como a baixa taxa de germinação e crescimento lento das mudas, necessitando em média de 12 anos para atingir seu tamanho comercial (DORNELES et al., 2013; MOREIRA et al., 2016). A recalcitrância da semente, ou seja, a intolerância à dessecação do embrião e seu armazenamento em baixas temperaturas, é outro obstáculo enfrentado pela

propagação seminífera, levando à perda de viabilidade e resultando em germinação lenta e desuniforme, o que é problemático para estabelecer plantios comerciais (BOVI; CARDOSO, 1975). As sementes possuem embrião pequeno, compreendendo apenas 0,54% da massa da matéria fresca das sementes e com alto grau de hidratação (85% de teor de água) (PANZA et al., 2004). O endosperma maciço compreende cerca de 99% da massa da matéria fresca da semente, tem um teor de água de 48,20% (PANZA et al., 2004). Durante a dessecação contínua, essa espécie apresenta um teor de água letal entre 18% e 24% (ANDRADE, 2001). Outros autores afirmam que abaixo de 20% de umidade as sementes de juçara perdem drasticamente sua capacidade de germinação, podendo ser alcançada com 16 dias de armazenamento em laboratório (ANDRADE; PEREIRA, 1997).

A espécie *E. edulis* é notável por seu potencial de manejo sustentável, desviando o foco da produção de palmito para a exploração dos frutos, especialmente para a obtenção de polpas (SILVA et al., 2006). Diversas pesquisas têm enfatizado o alto teor de polifenóis e a atividade antioxidante da polpa dos frutos de juçara, conferindo a esse alimento um *status* funcional devido à sua capacidade de combater os radicais livres (SILVA et al., 2006; MENEZES et al., 2008; LIMA et al., 2012).

O palmito de juçara é altamente valorizado na culinária, o que levou a uma intensa exploração comercial da espécie, especialmente na década de 1970 (SCHULZ et al., 2016). A extração do palmito envolve a remoção do meristema apical, um processo que requer a derrubada das plantas (MARTINELLI; MORAES, 2013). Como essa espécie possui um único caule e não tem a capacidade de perfilhar, o corte para a extração do palmito resulta na morte da planta (BOURSCHEID, 2011).

Dado que a espécie *E. edulis* pode demandar mais de uma década para atingir a maturidade reprodutiva (LEITMAN et al., 2013), a ausência de indivíduos adultos pode prejudicar a capacidade de regeneração dessa espécie (HEDRICK; GARCIA-DORADO, 2016), que se encontra classificada como vulnerável na Lista Brasileira de Espécies Ameaçadas de Extinção (BRASIL, 2022). Com isso, a embriogênese somática surge como uma proposta alternativa eficiente para a multiplicação de palmeiras (MOURA et al., 2008).

3.2 Cultura de tecidos vegetais e embriogênese somática

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica vital na biotecnologia moderna, proporcionando um meio eficiente para a propagação clonal, conservação de germoplasma e melhoramento genético de plantas (GEORGE et al., 2008). Este método envolve o cultivo de células, tecidos ou órgãos vegetais em condições controladas e estéreis, utilizando meios de cultura específicos que fornecem os nutrientes necessários para o crescimento e desenvolvimento *in vitro*.

Além disso, a cultura de tecidos vegetais surge como um processo que permite a produção em massa de plantas geneticamente idênticas, crucial para a agricultura e horticultura, garantindo a uniformidade e qualidade das colheitas (GEORGE et al., 2008). Além disso, esta técnica é fundamental para a conservação de espécies ameaçadas e de difícil propagação, como evidenciado em trabalhos com espécies raras e em risco de extinção, que podem ser mantidas e multiplicadas *ex situ* (BENSON, 2000).

No campo da biotecnologia, a cultura de tecidos é essencial para a engenharia genética, facilitando a transformação genética e a criação de plantas com características desejáveis, como resistência a doenças e tolerância a estresses abióticos (PEREZ-PEREZ et al., 2022). Este método também é utilizado na produção de compostos bioativos, como alcaloides e flavonoides, através da cultura de células suspensas, contribuindo para a indústria farmacêutica e de cosméticos (RAO; RAVISHANKAR, 2002). Assim, a cultura de tecidos vegetais é uma ferramenta indispensável para o avanço da pesquisa científica e para a sustentabilidade agrícola e ambiental.

A embriogênese somática é definida como o processo de desenvolvimento de embriões a partir de células somáticas, que não são produtos de fusão gamética (DODDS; ROBERTS, 1985). Embriões somáticos são obtidos a partir de dois padrões de desenvolvimento: a embriogênese somática indireta, que consiste no calo mantido formado e proliferado antes do desenvolvimento embrionário, e a embriogênese somática direta, que se baseia em embriões originários diretamente da superfície do explante, sem que passe pela fase de proliferação do calo (SHARP et al., 1980; MORDHORST et al., 1997).

No caso da embriogênese somática indireta, o explante cultivado desenvolve aglomerados de células que se dividem de forma sucessiva, formando nódulos

vasculares capazes de originar brotos, raízes ou embriões (DODDS; ROBERTS, 1985). O conceito inicial de embriogênese somática em ambiente controlado foi descrito pela primeira vez por Steward et al. (1958), utilizando tecidos de cenoura (*Daucus carota* L.). Esse marco inaugurou uma série de pesquisas explorando o potencial embriogênico de diversas espécies vegetais.

O sucesso da multiplicação *in vitro* depende de uma combinação adequada de diferentes variáveis e influência de diversos fatores como, condições e suplementação do meio de cultura, tipo do explante utilizado, genótipo da planta, além dos principais fatores abióticos (luz e temperatura) (JIMENEZ, 2005; ZAVATTIERI et al., 2010). Além disso, as concentrações de fitorreguladores utilizados nos meios de culturas são componentes que variam significativamente entre as técnicas utilizadas para a propagação *in vitro* (SOUZA et al., 1999).

A embriogênese somática apresenta-se como uma estratégia altamente promissora para a propagação vegetativa *in vitro*, destacando-se por uma série de vantagens (CARVALHO et al., 2006). Estas incluem uma elevada taxa de multiplicação da espécie, a possibilidade de ampliar a produção por meio da cultura em meio líquido, a capacidade de plantio direto da muda obtida por embriogênese somática e, em grande parte dos casos, a garantia de que as características genéticas serão idênticas às da planta-mãe (DODDS; ROBERTS, 1985). Além disso, essa abordagem permite a transferência de genes, tornando-se uma ferramenta valiosa em estudos de desenvolvimento vegetal, propagação clonal e melhoramento genético (CARVALHO et al., 2006). No entanto, é crucial ponderar sobre a desvantagem potencial variação somaclonal, sobretudo quando o propósito é a propagação clonal, e não a introdução deliberada de variabilidade genética (FEHER, 2003).

Uma grande diversidade de pesquisas foi realizada na área de multiplicação *in vitro*, principalmente em relação aos aspectos e definição de protocolos para a embriogênese somática em palmeiras, incluindo espécies como *Cocos nucifera* L. (VERDEIL et al., 1994), *Elaeis guineensis* Jacq. (BALZON et al., 2013), *E. edulis* (GUERRA: HANDRO, 1988; 1998) e *E. oleracea* (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012; FREITAS et al., 2016).

Na última década, a embriogênese somática tornou-se uma técnica essencial para a rápida multiplicação de diversas espécies, indo além da pesquisa para destacar-se na indústria (FEHER et al., 2003). Este processo é

particularmente valioso para investigar os mecanismos de diferenciação em plantas por explorar a manifestação da capacidade totipotente das células vegetais, requerendo diferentes abordagens da habilidade celular, definido como a capacidade de reprogramação de uma célula em reação a estímulos específicos, através de processos de desdiferenciação e rediferenciação (FEHER et al., 2003).

Em palmeiras, a seleção e propagação vegetativa de clones de alta qualidade é dificultada devido à ausência de câmbio vascular, o que impossibilita o crescimento secundário destas espécies (OLIVEIRA et al., 2022). O sucesso da embriogênese somática 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; PEREZ-NUÑEZ et al., 2006; SAENZ 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).

Nesse contexto, ela se destaca como uma técnica de grande relevância na área da cultura de tecidos vegetais, representando um conjunto de fases nas quais as células somáticas se desenvolvem em embriões, que se tornam um recurso valioso para essa espécie (MOURA et al., 2009; PINTO et al., 2011).

Essa técnica, em palmeiras, pode ser utilizada para clonagem em larga escala de progênes com alta qualidade, além de atuar na conservação de germoplasma ou atrelada diretamente a programas de melhoramento genético como um acelerador (LEDO et al., 2002; FREITAS et al., 2016).

3.3 Indução

A indução e o desenvolvimento de embriões somáticos são influenciados por uma complexa interação de fatores bióticos (genótipo, idade, tipo de explante, condições fisiológicas) e abióticos (composição do meio de cultura, fitorreguladores, luz, temperatura) (PINTO et al., 2008; ROSE et al., 2010). Além disso, fatores como a condição fisiológica do explante, características específicas da espécie e as condições experimentais, incluindo a composição do meio de cultura e a atmosfera durante o cultivo, são fundamentais para o processo de diferenciação celular (CHALUPA, 1999). A embriogênese somática geralmente é iniciada pela exposição

de células ou tecidos provenientes de diferentes explantes, como embriões zigóticos, inflorescências, ápices caulinares e folhas imaturas (FEHER, 2015).

Embriões somáticos são obtidos a partir de dois padrões de desenvolvimento: a embriogênese somática indireta, que consiste no calo mantido formado e proliferado antes do desenvolvimento embrionário, e a embriogênese somática direta, que se baseia em embriões originários diretamente da superfície do explante, sem que passe pela fase de proliferação do calo (SHARP et al., 1980; MORDHORST et al., 1997). Os dois padrões seguem a sequência de desenvolvimento do embrião zigótico, passando pelos estádios globular, cordiforme, torpedo e cotiledonares em espécies classificadas como eudicotiledôneas (GUERRA et al., 1999). No entanto, a sequência de desenvolvimento em espécies monocotiledôneas, se dá pelo embrião globular, passando para a fase escutelar, seguindo para a coleoptilar (FLOH et al., 2015).

O picloram é um fitorregulador que já vem sendo utilizado na embriogênese somática pela sua eficácia na absorção e mobilização, além de outros atributos, como à sua rápida metabolização em locais específicos da planta (KARUN et al., 2004), proporcionando bons resultados em palmeiras, como: *Bactris gasipaes* (VALVERDE et al., 1987; STEINMACHER et al., 2007), *Calamus merrillii* Becc. e *C. subinermis* Wendl. Ex Becc. (GOH et al., 1999; 2001) e *E. oleracea* (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012; FREITAS et al., 2016).

Para o gênero *Euterpe*, Freitas et al. (2016) destacam que a auxina picloram proporcionou melhores resultados no processo de indução de calos embriogênicos, tanto para inflorescências como para as folhas imaturas como fonte de explantes em *E. oleracea*. Na etapa de diferenciação, calos provenientes de inflorescências imaturas em meio de cultura com picloram apresentaram até 100% dos explantes com a presença de embriões somáticos. Em *E. edulis*, bainhas foliares extraídas de plântulas germinadas *in vitro* foram inoculadas em meio MS, suplementado com picloram (72,3 mg L⁻¹), resultando em formação de calos significativa, mostrando eficácia do indutor para a espécie (SALDANHA et al., 2006).

Além do picloram, o 2,4-D é um outro regulador que apresentou sucesso na indução em *E. edulis* (GUERRA; HANDRO, 1998), diferente do 4-CPA, pertencente ao mesmo grupo do 2,4-D, que ainda possui poucos relatos de uso na embriogênese somática de *E. edulis* (ALMEIDA, 2024).

Existem fitorreguladores análogos cujos registros de sua utilização na embriogênese somática são recentes, como por exemplo, o triclopir (ácido 3,5,6-tricloro-2-piridiniloxiacético), o fluroxypyr (ácido 4-amino-3,5-dicloro-6-fluoro-2-piridiloxiacético), o clopyralid (ácido 3,6-dicloro-piridina-2-carboxílico) e o aminopyralid (ácido 4-amino-3,6-dicloropiridina-2-carboxílico) (MELLO et al., 2024b).

Em embriões zigóticos de *E. edulis*, tem-se verificado baixos percentuais de oxidação e alto desenvolvimento de embriões somáticos com o uso do triclopir no processo de embriogênese somática, destacando seu uso na indução e quando combinado a diferentes fitorreguladores, mostrando ser um indutor com grande eficácia (CADE, 2023). Além disso, o autor, identificou em análises histológicas respostas celulares diferenciadas, destacando o potencial do triclopir em modular o ambiente para promover embriões somáticos.

A aplicação do triclopir tem demonstrado uma eficácia significativa na indução de respostas morfogenéticas para *E. edulis*, como a formação de calos e embriões somáticos, destacando-se como uma ferramenta promissora para estudos de biotecnologia vegetal e melhoramento genético (MELLO et al., 2024b).

A instigação de configurações complexas, como a gênese de um embrião somático, com o emprego de tecidos após ferimento, demanda o desencadeamento de um programa de desenvolvimento geneticamente codificado destinado à reparação das lesões, à desdiferenciação celular, à proliferação celular e à formação de novos órgãos (LUP et al., 2016). Quando segmentos de caulículo são seccionados pela metade, a auxina transportada a partir do ápice caulinar se concentra na extremidade superior do ponto de corte, sendo esgotada na extremidade inferior, promovendo a expressão gênica e desencadeando a localização da proliferação celular, com o intuito de reparar a lacuna presente no local da ferida (IKEUCHI et al., 2013). A lesão e a disposição adequada do explante no meio de cultura podem potencializar a capacidade de resposta, sendo imprescindível para a plasticidade do desenvolvimento e para a morfogênese de órgãos emergentes (FARIA et al., 2019).

Segmentos de caulículo com ferimento posicionados longitudinalmente para cima após 60 dias em meio de indução embriogênica com a presença de picloram (150 μ M), apresentaram médias máximas em números de pró-embriões e taxas de indução, constatando com menores taxas de oxidação (MELLO et al., 2024a).

Nesse contexto, poucos estudos são relatados envolvendo o uso de fitorreguladores análogos na embriogênese somática em *E. edulis*. Sendo assim, faz-se necessário mais pesquisas visando otimizar protocolos de embriogênese somática desta espécie de grande importância econômica e ecológica (OLIVEIRA et al., 2022).

4. METODOLOGIA

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

Os frutos de palmeira juçara foram obtidos na Região do Caparaó - ES/MG, mais precisamente no município de Pedra Menina - ES, das coordenadas 20°32'45,4" S, 41°49'35,7" W, aos 951 m de altitude, com a colheita de frutos em estágio de maturação incompleta, com aproximadamente 180 dias após a antese, identificados e imediatamente transportados em caixas de isopor para o Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV). Após a limpeza dos frutos, com detergente e água, o tegumento foi removido, e em seguida, as sementes foram imersas em uma solução de ácido ascórbico a 2%, para impedir a oxidação fenólica dos tecidos vegetais.

Na câmara de fluxo laminar, as sementes imaturas foram desinfestadas com imersão em álcool etílico a 70% por um minuto, em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2,5% (Super Globo®) agitando durante 10 minutos e em solução de amoxicilina® a 3.000 mg L⁻¹ também por 10 minutos, em que após cada solução de desinfestação, foi realizada a tríplice lavagem em água destilada e autoclavada.

Em seguida foram dispostas uma semente por tubo de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), constituindo de 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol, 1 g L⁻¹ de polivinilpirrolidona (PVP), 5,5 g L⁻¹ de ágar, com pH ajustado a 5,7 ± 0,1, autoclavado por 20 minutos. Ao final do processo, as sementes imaturas estabelecidas *in vitro* foram mantidas em sala de crescimento a 27 ± 2 °C, no escuro e por 180 dias (MELLO et al, 2024c).

4.1 Indução

Após 180 dias, as plântulas de juçara que apresentaram maior crescimento de parte aérea e diâmetro do coleto foram selecionadas e encaminhadas novamente para a câmara de fluxo laminar, onde foram divididas em segmentos cilíndricos, com aproximadamente 1 cm de comprimento, e seccionados longitudinalmente, em seguida, foram dispostos com a ferida voltada para cima em placas de Petri 90 x 15 mm contendo 20 mL de meio de cultura MS, constituindo de 30 g L⁻¹ de sacarose

com 0,1 g L⁻¹ mio-inositol, 1 g L⁻¹ de polivinilpirrolidona (PVP), 5,5 g L⁻¹ de ágar, com pH ajustado a 5,7 ± 0,1, autoclavado por 20 minutos.

Após autoclavagem, o meio foi suplementado com ácido 3,5,6-tricloro-2-piridiniloxiacético (triclopir) (Sigma®) filtrado, nas concentrações de 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, ou 160 µM. As placas de Petri contendo os segmentos de caulículo foram mantidas em sala de crescimento a 27 ± 2 °C no escuro, por 60 dias. As características analisadas após o período foram calogênese (%), oxidação (%), explantes não calejados (%) e número médio de pró-embriões.

O experimento foi disposto em delineamento inteiramente casualizado, com oito tratamentos de diferentes concentrações de triclopir (20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 µM), com 20 repetições, contendo seis explantes em cada placa. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste Tukey ($p < 0,05$), com auxílio do software R (R CORE TEAM, 2024).

4.2 Pré-maturação

Ao final do processo de indução embriogênica, após 60 dias, foi dado início a etapa de pré-maturação dos calos, em que, os explantes calejados foram selecionados e transferidos para placas de Petri 90 x 15 mm contendo 20 mL de meio de cultura MS, constituindo de 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol, 1 g L⁻¹ de polivinilpirrolidona (PVP), 5,5 g L⁻¹ de ágar, com pH ajustado a 5,7 ± 0,1, autoclavado por 20 minutos

As placas de Petri contendo os segmentos de caulículo calejados foram mantidas em sala de crescimento a 27 ± 2 °C no escuro, por 30 dias. As características analisadas após o período foram viabilidade de explantes (%), oxidação (%) e número médio de pró-embriões.

O experimento foi disposto em delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos de segmentos de caulículo calejados provenientes de diferentes concentrações de triclopir (20, 40, 60 e 80 µM), com quatro repetições, contendo cinco explantes em cada placa. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste Tukey ($p < 0,05$), com auxílio do software R (R CORE TEAM, 2024).

5. RESULTADOS

5.1 Indução

Os resultados indicam que as concentrações 20 e 40 μM de triclopir são eficazes na indução de calos embriogênicos em explantes de *E. edulis* com percentuais de calogênese de 58 e 54%, respectivamente, não diferenciando estatisticamente entre si. As demais concentrações do fitorregulador, apresentaram resultados inferiores a 30% (Figura 1).

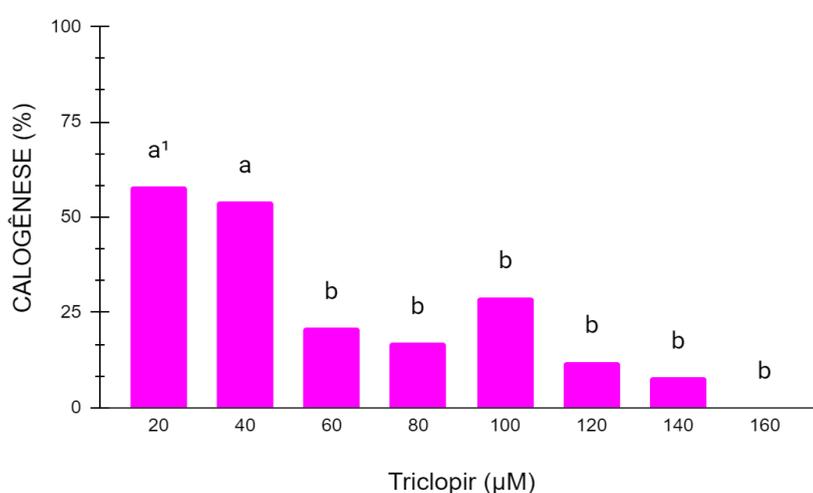


Figura 1 - Calogênese (%) de explantes de *E. edulis* em diferentes concentrações de triclopir. ¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).
Fonte: Autor (2024).

A oxidação (%) dos segmentos de caulículo de *E. edulis* foi de 37 e 30% para as concentrações 20 e 40 μM de triclopir, compreendendo os tratamentos com menores valores e não apresentando diferença estatística entre si. As concentrações 60, 80, 100 e 120 μM resultaram em 62, 58, 71 e 75% dos segmentos de caulículo oxidados, não apresentando diferença estatística entre si. As demais concentrações, 140 e 160 μM , apresentaram os maiores percentuais de oxidação (83 e 100%, respectivamente), indicando que altas concentrações podem ser fitotóxicas (Figura 2).

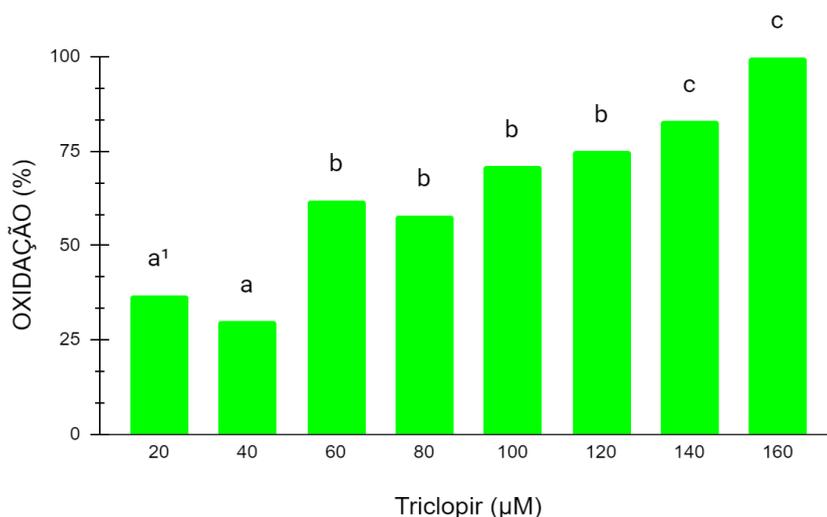


Figura 2 - Oxidação (%) de explantes de *E. edulis* em diferentes concentrações de triclopir. ¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).
Fonte: Autor (2024).

Os resultados para o percentual de explantes vivos que não formaram calos, não diferenciou estatisticamente entre as concentrações, com as concentrações 40 e 80 µM, apresentando valores ligeiramente superiores, com 25% dos explantes vivos após a etapa, e as demais concentrações, 20, 60, 120 e 140 µM apresentaram percentuais inferiores a 20%, resultando em 4, 17, 12 e 8%, respectivamente, com destaque negativo para as concentrações 100 e 160 µM, que apresentaram 0% de explantes vivos não calejados ao final do processo (Figura 3).

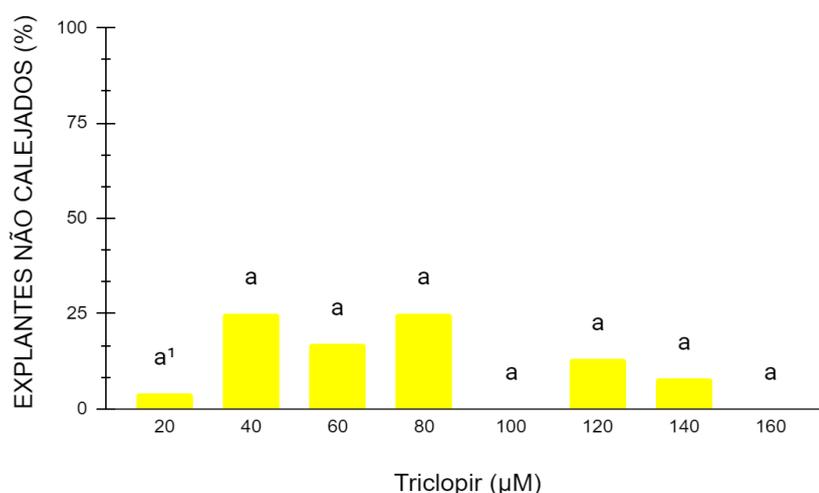


Figura 3 - Explantes vivos não calejados (%) de *E. edulis* em diferentes concentrações de triclopir. ¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).
Fonte: Autor (2024).

O número médio de pró-embriões formados em *E. edulis* foi baixo, com resultados observáveis apenas nas concentrações 20, 40, 60 e 100 μM de triclopir, compreendendo números médios de 0,6, 0,2, 0,6 e 0,8, respectivamente (Figura 4).

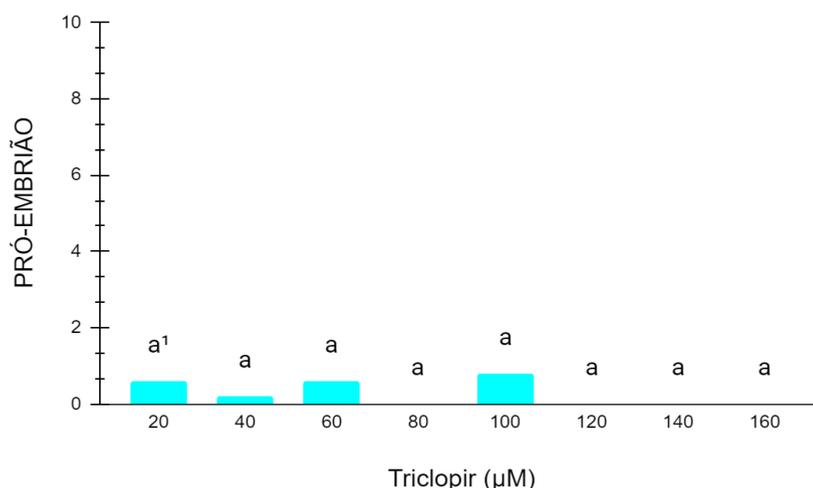


Figura 4 - Número médio de pró-embriões formados em explantes de *E. edulis* em diferentes concentrações de triclopir. ¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Autor (2024).

Em resumo, as menores concentrações (20 e 40 μM) de triclopir se destacaram entre as demais, apresentando resultados superiores das demais no processo de calogênese e menores taxas de oxidação, diante ao processo de indução embriogênica em *E. edulis*. Contudo, as concentrações de 40 e 80 μM evidenciaram percentuais de explantes vivos sem a formação de calos ligeiramente superiores aos resultados apresentados pelas demais concentrações. O número médio de pró-embriões formados não difere estatisticamente entre as concentrações, sendo os valores mais elevados observados em 100 μM (Figura 5).

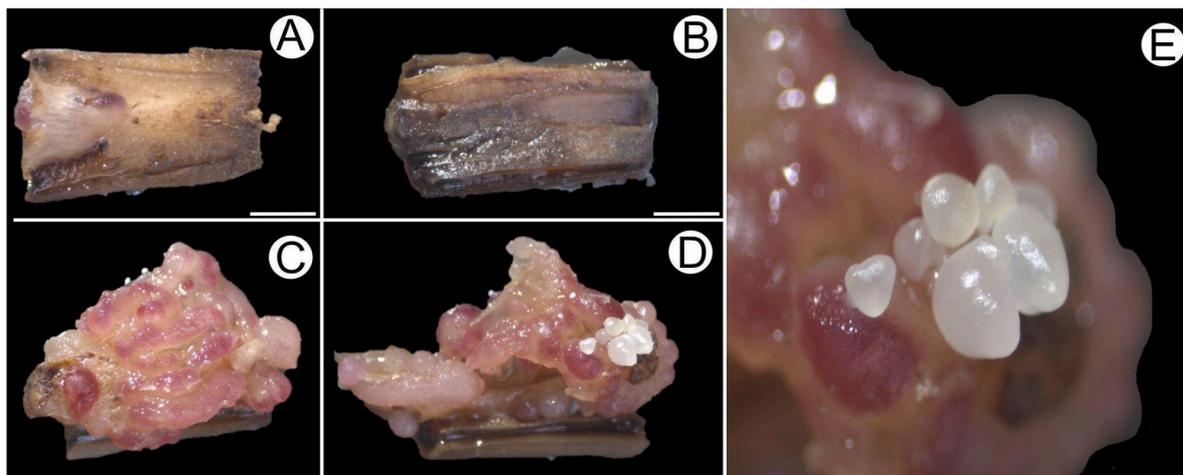


Figura 5 - Morfologia de calos e embriões somáticos obtidos durante a indução embriogênica de *E. edulis*, a partir de segmentos de caulículo, em meio de cultura suplementado com 20 μM de triclopir. (A) Explante não oxidado e sem a presença de calos. (B) Explante totalmente oxidado. (C) Explante com a presença de calos. (D) Explante calejado com a presença de embriões somáticos. (E) Embriões somáticos. Barra: 1 mm.

Fonte: Autor (2024).

5.2 Pré-maturação

A concentração 20 μM apresentou 87% de viabilidade dos segmentos de caulículo de *E. edulis*, sendo o melhor tratamento após o período. As demais concentrações de triclopir, 40, 60 e 80 μM resultaram em 67 e 79 e 54% de viabilidade de explantes, respectivamente, não se diferenciando significativamente (Figura 6).

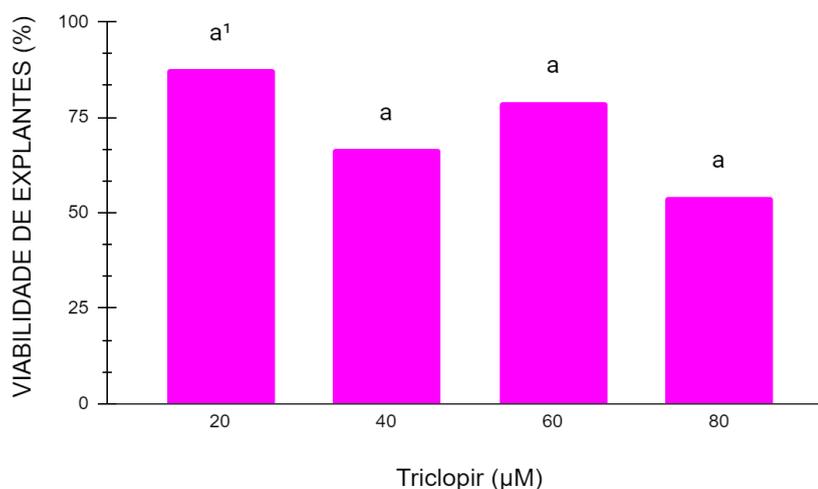


Figura 6 - Viabilidade de explantes (%) de *E. edulis* após o período de pré-maturação em meio de cultura basal. ¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Fonte: Autor (2024).

Não se obteve percentual de oxidação para a concentração 20 μM , enquanto os demais tratamentos, 40, 60 e 80 apresentaram percentuais inferiores a 50% de oxidação, não diferenciando estatisticamente entre si (Figura 7).

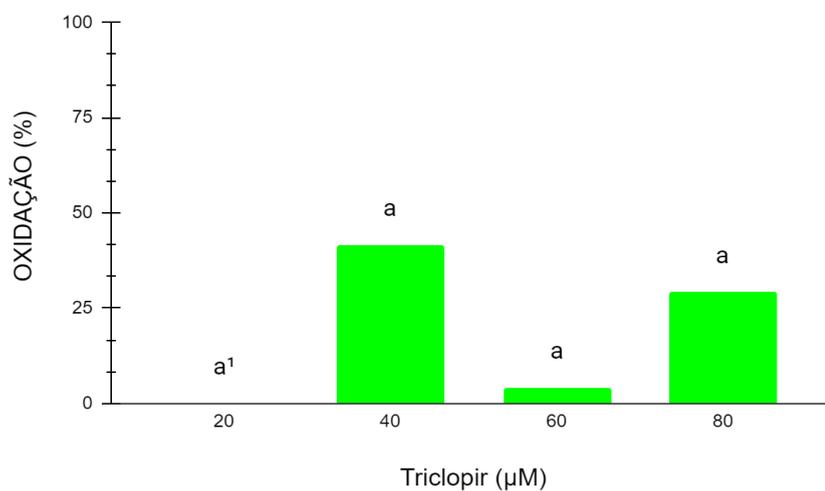


Figura 7 - Oxidação (%) de explantes de *E. edulis* após o período de pré-maturação em meio de cultura basal. ¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Fonte: Autor (2024).

Os número médio de pró-embriões formados em segmentos de caulículo de *E. edulis* não apresentou diferença estatística entre as concentrações estudadas (Figura 8).

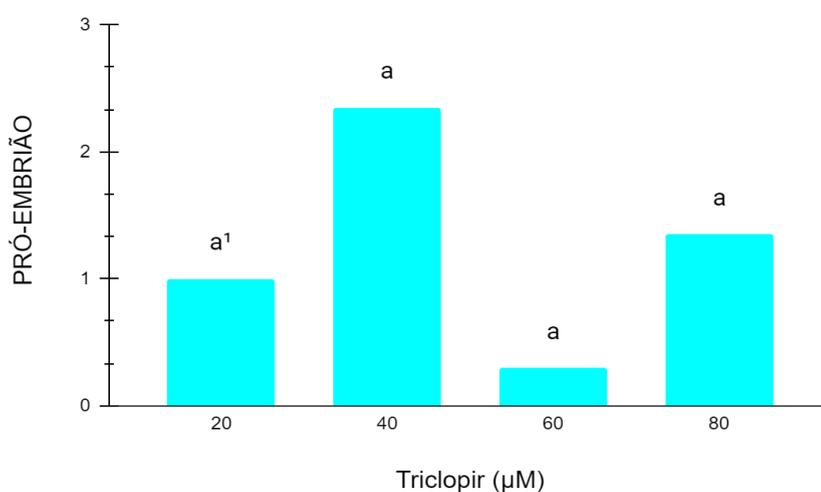


Figura 8 - Número médio de pró-embriões formados em explantes de *E. edulis* após o período de pré-maturação em meio de cultura basal. ¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Autor (2024).

Em resumo, a concentração de 20 μM de triclopir mostrou maior viabilidade de segmentos de caulículo de *E. edulis*, enquanto as concentrações de 40, 60 e 80 μM resultaram menores valores, sem diferenças significativas entre os tratamentos. A concentração de 20 μM de triclopir não resultou em oxidação nos explantes calejados, enquanto 40, 60 e 80 μM quando somadas, resultam em 75% de oxidação em *E. edulis*, sem diferenças estatísticas significativas entre elas. O número médio de pró-embriões formados não difere estatisticamente entre as concentrações, sendo os valores mais elevados observados em 40 μM (Figura 9).

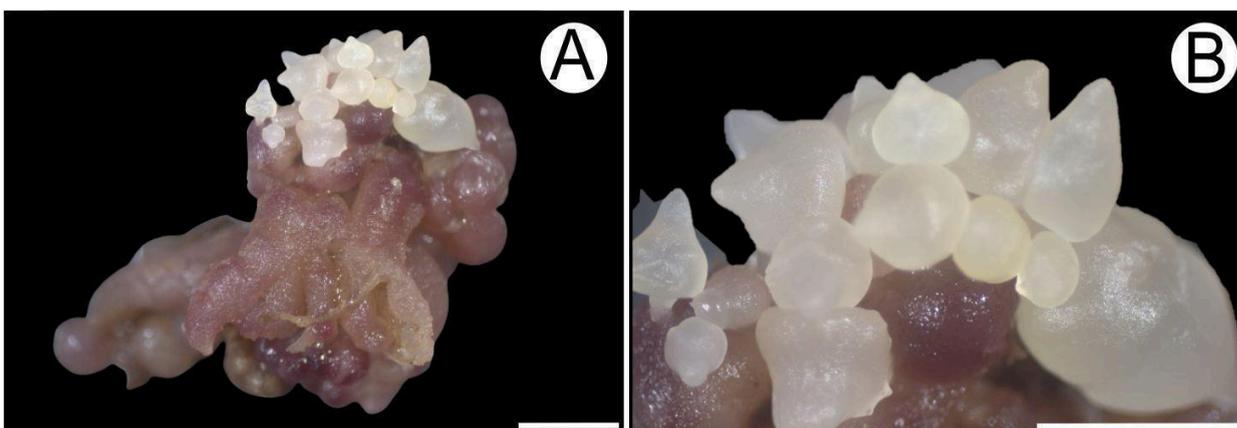


Figura 9 - Morfologia de embriões somáticos após o processo de pré-maturação de calos embriogênicos de *E. edulis*, a partir de segmentos de caulículo, em meio de cultura basal. (A; B) Calos e embriões somáticos. (C; D) Embriões somáticos. Barra: 1 mm.

Fonte: Autor (2024).

As demais concentrações utilizadas durante a etapa de indução embriogênica não foram replicadas devido à falta de material para execução, e com isso, as concentrações 100, 120 e 140 μM tiveram apenas uma repetição em análise e não foram analisadas estatisticamente, correspondendo a 60% para as concentrações 100 e 140 μM , e 100% dos explantes viáveis para a concentração 120 μM . Para a oxidação, as concentrações, que não foram replicadas, corresponderam a 40% e 20% para 100 e 140 μM , e 0% dos explantes oxidados para a concentração 120 μM . As concentrações não replicadas apresentaram valores médios de 7,6 e 15,6 para as concentrações 100 e 140 μM , enquanto, a concentração 120 μM não apresentou

número médio de pró-embriões formados. A concentração 160 μM não foi replicada devido a alta porcentagem de oxidação durante o processo de indução embriogênica.

6. DISCUSSÕES

6.1 Indução

A indução de calos embriogênicos mostrou resultados satisfatórios com o uso do triclopir, em que as concentrações de 20 e 40 μM se destacaram das demais, promovendo os maiores valores de calogênese de 58% e 54%, respectivamente (Figura 1). Esses resultados corroboram com estudos prévios que enfatizam a importância de concentrações ótimas de indutores para o sucesso da embriogênese somática (IKEUCHI et al., 2013).

Estudos como o de Mello et al., (2024a) demonstram que concentrações subótimas de indutores podem resultar em calos não embriogênicos, enquanto concentrações excessivas podem levar à morte celular e inibir a formação de calos. Os resultados obtidos estão em consonância com essa observação, pois concentrações mais altas de triclopir apresentaram taxas reduzidas de calogênese.

Estes resultados corroboram com os estudos que demonstram a eficácia de baixas concentrações de auxinas, como o 2,4-D e o picloram, na indução de calos em culturas de tecido vegetal, assim como relatado por Guerra e Handro (1998), que observaram que a adição de 2,4-D em concentrações específicas pode induzir a formação de calos em *E. edulis* (SALDANHA; MARTINS-CORDER, 2012).

No entanto, as demais concentrações de triclopir apresentaram valores inferiores a 30%. Este resultado sugere que há um limite ótimo para a concentração de triclopir na indução de calos embriogênicos, além do qual a eficácia diminui significativamente. Esse comportamento é semelhante ao observado em outros estudos, onde concentrações elevadas de reguladores de crescimento apresentam efeitos fitotóxicos, inibindo a formação de calos e promovendo a oxidação dos explantes (MELLO et al., 2024a).

Na concentração 100 μM e quando combinado a outros fitorreguladores, o triclopir resulta em percentuais de calogênese significativamente maiores em embriões zigóticos como explante, sugerindo um possível efeito positivo do herbicida auxínico em concentrações mais elevadas (CADE, 2023).

A eficácia do triclopir em promover a embriogênese somática é corroborada por estudos como os de Girijashankar (2011), que apontam a importância de reguladores de crescimento específicos na formação de calos embriogênicos. As

concentrações superiores apresentaram valores significativamente inferiores, alinhando-se com a literatura que sugere que concentrações mais altas de reguladores de crescimento podem ser inibitórias (IKEUCHI et al., 2013).

O baixo percentual de calogênese das concentrações mais elevadas é explicado pela teoria do estresse químico, onde altas concentrações de agentes indutores podem causar danos oxidativos aos explantes, prejudicando a formação de calos, além de danos que afetam diretamente a viabilidade dos explantes e a indução de calos embriogênicos, promovendo maiores níveis de oxidação (JIMENEZ, 2005; ZAVATTIERI et al., 2010).

Isso ocorre porque esses compostos podem aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que danificam lipídios, proteínas e DNA das células (GILL; TUTEJA, 2010). Assim, os níveis elevados de triclopir podem ter induzido esse estresse oxidativo, reduzindo a capacidade dos explantes de formar calos saudáveis. Quando as células são submetidas a estresse químico, elas ativam uma série de respostas de defesa que podem incluir a morte celular programada, levando a uma menor viabilidade dos explantes e, conseqüentemente, uma menor taxa de formação de calos (ZAVATTIERI et al., 2010).

A exposição prolongada a altas concentrações de reguladores de crescimento pode resultar em fitotoxicidade e baixa eficiência na formação de calos (FEHER et al., 2003). Segundo estes autores, esse fenômeno ocorre porque a toxicidade elevada compromete a integridade celular e os processos metabólicos necessários para a indução e manutenção de calos.

Em embriões zigóticos de *E. edulis*, observou-se elevados percentuais de calogênese, com 100% dos explantes calejados em meio de cultura suplementado com picloram e triclopir, de forma isolada e quando combinados (ALMEIDA, 2024).

Em *Areca catechu* L., não foi possível observar respostas de folhas quanto ao desenvolvimento de calos embriogênicos em meio de cultura suplementado com 68 μM de 2,4-D (KARUN et al., 2004). Em *Phoenix canariensis* Hort. ex Chabaud, Huong et al. (1999) destacaram que concentrações superiores a 90,5 μM de 2,4-D inibiram o processo de indução de calos. Feher et al. (2003) relatam que, auxinas sintéticas, apresentam influência no processo de indução embriogênica, principalmente em relação à auxina e como um componente com capacidade de promoção de estresse, sendo esse, um importante fator relacionado à aquisição da competência embriogênica.

Reguladores de crescimento em altas concentrações podem causar desequilíbrios hormonais e estresse osmótico, o que também contribui para a baixa eficiência na formação de calos (MISHRA et al., 2006). Ademais, o desequilíbrio hormonal pode alterar a expressão de genes críticos para a regeneração e o desenvolvimento dos calos, enquanto o estresse osmótico pode levar à perda de turgescência celular, essencial para a divisão e expansão celular (MISHRA et al., 2006).

A indução de respostas de defesa nas plantas, em níveis elevados de reguladores de crescimento, pode interferir nos processos normais de crescimento e desenvolvimento celular (PITZSCHKE et al., 2006). Ainda enfatizam que, a resposta de defesa inclui a produção de EROs, que, em níveis elevados, podem ser deletérias às células vegetais.

No presente trabalho, as menores concentrações (20 e 40 μM) apresentaram menor oxidação (37% e 30%, respectivamente), sugerindo que doses moderadas do indutor minimizam o estresse oxidativo (Figura 2).

Em palmeiras, a oxidação de tecidos cultivados a partir da propagação *in vitro* é relatada com elevada frequência (SUGIMURA; SALVANA, 1989; TEIXEIRA et al., 1994; STEINMACHER et al., 2007; SAENZ et al., 2010), destacando-se quando são cultivados em concentrações mais elevadas (LEDO et al., 2002). Freitas et al. (2016) observaram em embriões zigóticos de *E. oleracea*, oxidação de até 100% dos explantes em meio de cultura suplementado com 2,4-D à 450 μM .

Os efeitos do processo de oxidação ocorrem devido à liberação de compostos fenólicos de tecidos *in vitro*, proporcionando escurecimento dos explantes (OLIVEIRA, 2022; JONES; SAXENA, 2013) e inibindo o crescimento celular (NAZ et al., 2008; AHMAD et al., 2013). Além disso, baixas concentrações podem influenciar a atividade de enzimas antioxidantes endógenas, como superóxido dismutase (SOD), catalase e glutatona peroxidase (GPx). Estas enzimas tem a capacidade de neutralizar radicais livres e proteger as células contra danos oxidativos (YU et al., 2024).

A embriogênese somática destaca a importância dos reguladores de crescimento das plantas, como auxinas e citocininas, na regulação dos processos celulares que minimizam o estresse oxidativo e promovem a viabilidade dos explantes (MÉNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019).

Concentrações mais altas de triclopir, entre 60 e 120 μM , apresentaram porcentagens de oxidação significativamente maiores em segmentos de caulículo de *E. edulis* (Figura 2). Isto sugere que concentrações elevadas de triclopir podem induzir um aumento no estresse oxidativo, prejudicando a viabilidade dos explantes e a eficiência da embriogênese somática. Estudos sobre a indução de embriogênese somática em culturas de *Elaeis guineensis* Jacq. relataram que altas concentrações de auxinas podem induzir estresse oxidativo, reduzindo a eficiência da formação de embriões somáticos (VUTTIPONGCHAIKIJ; JANTASURIYARAT, 2023).

As concentrações mais elevadas de triclopir (140 e 160 μM), apresentaram os maiores percentuais de oxidação, 83% e 100%, respectivamente. Esses resultados corroboram com a literatura, onde a exposição a níveis elevados de reguladores de crescimento das plantas pode resultar em acúmulo de EROs, levando à oxidação celular e morte dos explantes (NIC-CAN et al., 2016), que é esperado devido ao acúmulo excessivo de EROs que compromete seriamente a viabilidade celular (FOYER; NOCTOR, 2013).

As EROs, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são conhecidas por seu papel dual em células vegetais, atuando tanto como moléculas sinalizadoras quanto como agentes tóxicos dependendo da sua concentração e localização celular (MITTLER, 2017). Em níveis baixos a moderados, elas podem induzir respostas de defesa e adaptação ao estresse. No entanto, em concentrações elevadas, as EROs causam peroxidação lipídica, danos ao DNA e oxidação de proteínas, resultando em morte celular (DIETZ et al., 2016).

O percentual de explantes vivos que não formaram calos, foi maior nas concentrações de 40 e 80 μM , com 25% de explantes vivos (Figura 3). Esse parâmetro é crucial para a manutenção de culturas viáveis a longo prazo, sugerindo que essas concentrações não são tão fitotóxicas quanto outras, permitindo uma maior sobrevivência dos explantes (MELLO et al., 2024). Concentrações de 100 e 160 μM , no entanto, não mantiveram nenhum explante vivo, corroborando a hipótese de que altas concentrações de auxinas sintéticas podem ser letais para os tecidos vegetais (SALDANHA; MARTINS-CORDER, 2012; MELLO et al., 2024). Em *Larix kaempferi* (Lamb.) Carr., a capacidade de regeneração foi um fator determinante para o sucesso da transformação genética e propagação clonal (ZHANG et al., 2021). O resultado está em concordância com os estudos de Soares et al. (2013), que observaram que concentrações intermediárias

de reguladores de crescimento mantiveram os explantes viáveis em culturas de *Dendrobium nobile* (Lindl.). Concentrações superiores e inferiores mostraram viabilidade reduzida, onde nenhum explante permaneceu vivo, sugerindo toxicidade aguda em níveis elevados, como discutido por Tyczewska et al. (2021) em culturas de *Zea mays* L.

Essa relação entre concentração e os explantes que se mantiveram vivos, mas não calejaram, reforça a necessidade de otimização da dosagem para minimizar danos e maximizar a embriogênese somática (JHA et al., 2007; GEORGE et al., 2008). Esses resultados corroboram com a ideia de que concentrações moderadas do indutor promovem um ambiente mais favorável à sobrevivência dos explantes, minimizando o estresse e otimizando as condições para a formação de calos. Concentrações superiores a 100 μM , por outro lado, comprometeram drasticamente essa viabilidade, com destaque para a concentração de 160 μM , que não apresentou nenhum explante vivo (Figura 3).

A formação de pró-embriões, estruturas precursoras dos embriões, representa o estágio final da embriogênese somática e garante a regeneração de novas plantas (MELLO et al, 2024a).

O número médio de pró-embriões formados em todos os segmentos de caulículo foi baixo, independentemente da concentração, sugerindo que a embriogênese em *E. edulis* é um processo delicado e sensível a fatores externos (Figura 4). Em embriões zigóticos de *E. edulis*, estudos realizados afirmam que o uso do triclopir (100 μM), se destaca entre os demais indutores embriogênicos na formação de pró-embriões, diminuindo com o aumento das concentrações (MELLO et al., 2024a).

Em outros estudos com embriões zigóticos de *E. edulis*, o número médio de pró-embriões formados com o uso de picloram combinado ao triclopir foi ligeiramente superior quando comparado ao picloram utilizado de forma isolada, resultando em números médios de 5,95 (picloram combinado ao triclopir) e 5,65 (picloram utilizado de forma isolada) (ALMEIDA, 2024). As concentrações de 150, 200 e 450 μM de picloram resultaram em maiores formações de centros embriogênicos em caulículo de plântulas de *E. edulis* onde a concentração de 150 μM estimulou a maior formação de pró-embriões (MELLO et al., 2024a).

Corroborando com esses resultados, Cade (2023) verificou que, em embriões zigóticos de *E. edulis*, para as médias de número de embriões somáticos, os

tratamentos triclopir e sua combinação com picloram, se destacaram frente aos demais tratamentos, diferenciando estatisticamente, sendo o tratamento com triclopir apresentando-se 125% superior ao tratamento com picloram, e quando realizada a combinação de ambos fitorreguladores, o resultado é 100% superior ao uso isolado do picloram.

Esse desafio pode estar relacionado à complexa natureza da embriogênese somática em *E. edulis*, exigindo otimizações adicionais do protocolo, como a suplementação com outros fitohormônios ou a exploração de diferentes tipos de explantes (POSADA; VEGA, 2005; MELLO et al., 2024a).

6.2 Pré-maturação

A pré-maturação de calos embriogênicos de segmentos de caulículo de *Euterpe edulis* Martius é um processo crucial para o desenvolvimento de técnicas de cultura de tecidos em plantas, especialmente para espécies com importância ecológica e econômica como a palmeira juçara (OLIVEIRA et al., 2022; MELLO et al., 2024b).

Os resultados indicam que a concentração 20 μM de triclopir foi a mais eficiente, apresentando uma taxa de viabilidade de explantes de 87% (Figura 6). Este dado é corroborado por estudos que indicam e enfatizam a importância de ajustar a concentração de reguladores de crescimento para otimizar a resposta embriogênica em culturas de tecidos vegetais (JIMENEZ, 2005).

Concentrações mais altas (40, 60 e 80 μM) mostraram variações na taxa de viabilidade, com percentuais de 67%, 79% e 54%, respectivamente (Figura 6). Estes resultados sugerem que, embora existam variações nas respostas, as concentrações mais altas de triclopir podem afetar no processo de formação e desenvolvimento de calos viáveis (KARAMI, 2008).

A concentração de 120 μM apresentou a maior eficiência com 100% dos explantes viáveis, sugerindo um potencial para altos níveis de concentração em situações específicas, como descrito por George et al. (2008), embora mais replicações sejam necessárias para validar esses resultados.

A concentração de 20 μM também foi a única que não apresentou percentual de oxidação, um fator crítico para o sucesso da cultura de tecidos, pois a oxidação pode prejudicar o desenvolvimento dos calos embriogênicos (THORPE, 2007).

As outras concentrações (40, 60 e 80 μM) apresentaram percentuais de oxidação de 42%, 4% e 29%, respectivamente, destacando a ausência de oxidação em 20 μM (Figura 7), que reforça a eficácia desta concentração, especialmente pela sua segurança e viabilidade para uso em protocolos de pré-maturação (GEORGE et al., 2008).

Para as concentrações de 100, 120 e 140 μM , os percentuais de oxidação foram de 40%, 0% e 20%, respectivamente. A ausência de oxidação na concentração de 120 μM é um dado interessante que pode vir a se tornar um indicador de uma janela de concentração ótima para minimizar a oxidação, contudo, mais estudos replicados são necessários para confirmar este achado.

A concentração de 40 μM foi a que apresentou o maior número de pró-embriões formados, com uma média de 2,35 (Figura 8). Isso é significativo porque a formação de pró-embriões é um indicador chave da competência embriogênica dos calos (GUTIERREZ-MORA et al., 1999). As outras concentrações (20, 60 e 80 μM) tiveram valores médios inferiores a 2 (Figura 8), correspondendo a estudos que destacam o uso de concentrações ótimas de reguladores de crescimento, que podem variar dependendo do tipo de tecido utilizado como explante e da espécie de planta (JIMENEZ, 2005).

As concentrações não replicadas (100 e 140 μM) mostraram valores médios superiores, com 7,6 e 15,6 pró-embriões, respectivamente, enquanto a concentração de 120 μM não apresentou formação de pró-embriões. Calos obtidos após indução com triclopir (100 μM) em embriões zigóticos de *E. edulis* apresentaram um forte aumento em embriões somáticos (+153,44%) quando transferidos para a pré-maturação em meio basal e durante 30 dias (MELLO et al., 2024b).

E. oleraceae, cultivada por 30 dias em meios de diferenciação e maturação, resultando em apenas embriões globulares esbranquiçados e compactos, além de embriões somáticos translúcidos cuja aparência tornava-se leitosa somente após 80 dias (FREITAS et al., 2016).

Em *E. precatoria*, o processo de incubação por 60 dias em meios de diferenciação e maturação, resultou em embriões somáticos em sua maioria alongados, com coloração branca opaca semelhante à observada na fase de desenvolvimento torpedo (FERREIRA et al., 2022).

O meio de pré-maturação foi essencial para o crescimento e desenvolvimento dos embriões somáticos, com aspecto leitoso em todos os estágios de maturação

em 30 dias, favorecendo também a germinação de embriões em fases mais avançadas (MELLO et al., 2024b).

7. CONCLUSÃO

A concentração de 20 μM de triclopir destacou-se das demais por proporcionar maior calogênese e menor percentual de oxidação, revelando-se eficaz na indução de calos embriogênicos em *Euterpe edulis* Martius.

A concentração de 40 μM de triclopir apresentou resultados superiores, particularmente na formação de pró-embriões após a pré-maturação em meio de cultura basal.

O processo de pré-maturação contribuiu para o aumento do número médio de pró-embriões formados mediante as concentrações estudadas durante esta etapa.

Concentrações superiores de triclopir demonstraram percentuais elevados de oxidação e menor viabilidade dos explantes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M. R. **Melhoramento genético de *Euterpe edulis*: Um estudo sobre a aplicação de indutores auxínicos na embriogênese somática**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, ES, 2024.
- ANDRADE, A. C. S. The effect of moisture content and temperature on the longevity of heart of palm seeds (*Euterpe edulis* M.). **Seed Science and Technology**, v. 29, p. 171-182, 2001.
- ANDRADE, A. C. S.; PEREIRA, T. S. Comportamento de armazenamento de sementes de palmitero (*Euterpe edulis* Mart.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n. 10, p. 987-991, 1997.
- BALZON, T. A.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. 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**, v. 49, n. 1, p. 41-50, 2013.
- BENSON, E. E. *In vitro* plant recalcitrance: an introduction. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 36, n. 3, p. 141-148, 2000.
- BOURSCHEID, K. *Euterpe edulis* - Palmito juçara. In: CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro - Região Sul**. Brasília – DF: Ministério do Meio Ambiente, v. 2, p. 179–183, 2011.
- BOVI, M. L. A.; CARDOSO, M. Germinação de sementes de palmitero (*Euterpe edulis* Mart.). **Bragantia**, v. 34, n. 7, p. 23-29, 1975.
- BOVI, M. L. A.; CARDOSO, M. Conservação de sementes de palmitero (*Euterpe edulis* Mart.). **Bragantia**, v. 37, p. 65-71, 1978.
- BOVI, M. L. A.; GODOY JR. G.; SAES, L. A.; MORI, E. E. E. **Subsídios para o sistema de manejo auto-sustentado do palmitero**. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, p. 1–25, 1992.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. MAPA/DAS/ACS. 395p. 2009.

BRASIL. Instrução normativa nº 148. **Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, s. 1, p. 282, 2022.

CADE, S. E. **Combinações de reguladores de crescimento com aminoácido como indutores embriogênicos em *Euterpe edulis* Martius**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Agronomia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2023.

CARDOSO, A.; LIZ, S.; RIEGER, D.; FARAH, A.; VIEIRA, F. K.; ASSIS, M. A.; DI PIETRO, P. An update on the biological activities of *Euterpe edulis* (juçara). **Planta Medica**, v. 84, n. 8, p. 487-499, 2018.

CARVALHO, G. C. Alterações morfológicas e fisiológicas no desenvolvimento de embriões somáticos de *Euterpe edulis* (Mart.) Palm (Arecaceae). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 2, p. 567-574, 2013.

CARVALHO, J. M. F. C.; LIMA, M. M. A.; AIRES, P. S. R.; VIDAL, M. S.; PIMENTEL, N. W. **Embriogênese somática**. EMBRAPA Algodão, v. 152, p. 35, 2006.

CHALUPA, V. Somatic embryogenesis in linden (*Tilia* spp.). In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWTON, R. J. **Somatic embryogenesis in woody plants**. Kluwer Academic Publishers, v. 5, p. 31-43, 1999.

COELHO, G. M. **Estrutura genética populacional em morfotipos de *Euterpe edulis***. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, 2010.

CRUZ, C. D. Genes Software - extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 38, n. 4, p. 547-552, 2016.

CURSI, P. R.; CICERO, S. M. Fruit processing and the physiological quality of *Euterpe dulis* Martius seeds. **Journal of Seed Science**, v. 36, p. 134-142, 2014.

DIETZ, K. J.; MITTLER, R.; NOCTOR, G. Recent progress in understanding the role

of reactive oxygen species in plant cell signaling. **Plant Physiology**, v. 171, e. 3, p. 1535–1539, 2016.

DODDS, J. H.; ROBERTS, L. W. **Experiments in plant tissue culture**. Cambridge University Press, ed. 2, p. 216, 1985.

DORNELES, L. L.; ZILLIKENS, A.; STEINER, J.; PADILHA, M. T. S. 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**, v. 68, n. 1, p. 47-57, 2013.

ELHITI, M.; HEYWOOD, S.; PATEL, M.; MARTIN, M. H.; EL-SHEIKH, M. A. Somatic embryogenesis: recent advances and future prospects. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 113, n. 1, p. 125-135, 2013.

ELHITI, M.; STASOLLA, C.; WANG, A. Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 49, p. 631-642, 2013.

FARIA, D. V.; CORREIA, L. N. F.; MATOS, E. M.; SOUZA, M. V. C.; BATISTA, D. S.; COSTA, M. G. C.; PAIVA NETO, V. B.; XAVIER, A.; ROGALSKI, M.; OTONI, W. C. Wounding and medium formulation affect de novo shoot organogenic responses in hypocotyl-derived explants of annatto (*Bixa orellana* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 55, p. 277-289, 2019.

FERREIRA, J. C. B.; SILVA-CARDOSO, I. M. A.; MEIRA, R. O.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of the palm tree *Euterpe precatoria* Mart. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 148, 2022.

FEHER, A.; PASDORF, T.; DUDITS, D. Plant embryogenesis – how we can make it even better. **Trends in Plant Science**, v. 8, p. 78-84, 2003.

FEHER, A. Somatic embryogenesis - Stress-induced remodeling of plant cell fate. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 18, n. 49, p. 385- 402, 2015.

FEHER, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, p. 201- 228, 2003.

FERREIRA, J. C. B.; SILVA-CARDOSO, I. M. A.; MEIRA, R. O.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of the palm tree *Euterpe precatoria* Mart. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 148, p. 667-686, 2022.

FLOH, E. I. S.; DOS SANTOS, A. L. W.; DEMARCO, D. Embriogênese vegetal: abordagens básicas e biotecnológicas. In: RESENDE, R. R.; SOCCOL, C. R. **Biotecnologia Aplicada à Saúde**, v. 1, n. 1, p. 1-15, 2015.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. **Plant Cell**, v. 17, n. 7, p. 1866-1875, 2005.

FREITAS, E. O.; MONTEIRO, T. R.; NOGUEIRA, G. F.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos of the açai palm (*Euterpe oleracea*): Induction of embryogenic cultures, morphoanatomy and its morphological characteristics. **Scientia Horticulturae**, v. 212, p. 126-135, 2016.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. Springer, ed. 3, 2008.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

GIRIJASHANKAR, V. *In vitro* regeneration of *Eucalyptus camaldulensis*. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 1, n. 18, p. 79-87, 2012.

GOH, D. K. S.; MICHAUX-FERRIÈRE, N.; MONTEUUIS, O.; BOM, M-C. Evidence of somatic embryogenesis from root tip explants of the rattan *Calamus manan*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 35, n. 5, p. 424-427, 1999.

GOH, D. K. S.; BOM, M. C.; ALIOTTI, F.; ESCOUTE, J.; FERRIÈRE N.; MONTEUUIS, O. *In vitro* somatic embryogenesis in two major rattan species:

Calamus merrillii and *Calamus subinermis*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 37, n. 3, p. 375-381, 2001.

GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 34, n. 1, p. 200-205, 1998.

GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo cultures of *Euterpe edulis* Mart (Palmae). **Plant Cell Reports**, v. 7, n. 7, p. 550-552, 1988.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. 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, v. 2, p. 533-568, 1999.

GUTIERREZ-MORA, A.; GEUNS, J. M. C.; SWENNEN, R. The use of auxins to improve plant regeneration in plantain (*Musa* spp., AAB-group). **Scientia Horticulturae**, v. 82, n. 3-4, p. 275-282, 1999.

HEDRICK, P. W.; GARCIA-DORADO, A. Understanding inbreeding depression, purging, and genetic rescue. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 31, n. 12, p. 940–952, 2016.

HUONG, L. T. L.; BAIOTTO, M.; HUY, B. P.; MEZZETTI, B.; SANTILOCCHI, R.; ROSATI, P. Somatic embryogenesis in Canary Island date palm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 56, n. 1, p. 1-7, 1999.

IKEUCHI, M.; SUGIMOTO, K.; IWASE, A. Plant callus: mechanisms of induction and repression. **The Plant Cell**, v. 25, p. 3159-3173, 2013.

JHA, T. B.; MUKHERJEE, P.; DATTA, M.M. Embriogênese somática em *Jatropha curcas* Linn., uma importante planta de biocombustível. **Plant Biotechnology**, v. 1, p. 135–140, 2007.

JIMENEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, v. 47, p. 91-110, 2005.

JONES, A. M. P.; SAXENA, P. K. Inhibition of phenylpropanoid biosynthesis in *Artemisia annua* L.: a novel approach to reduce oxidative browning in plant tissue culture. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. 1-13, 2013.

KARAMI, O. Factors affecting somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 93, n. 1, p. 86-107, 2008.

KARUN, A.; SIRIL, E. A.; RADHA, E.; PARTHASARATHY, V. A. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.). **Current Science**, v. 86, n. 12, p. 1623-1628, 2004.

KONAN, E. E.; DURAND-GASSELIN, T.; KOUADIO, Y. J.; FLORI, A.; RIVAL, A.; DUVAL, Y.; PANNETIER, C. *In vitro* conservation of oil palm somatic embryo for 20 years on a hormone-free culture medium: characteristics of the embryogenic cultures, derived plantlets and adult palms. **Plant Cell Reports**, v. 29, p. 1-13, 2010.

LEDO, A. S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K.; MENEZES, I. C.; OLIVEIRA, M. S. P.; MEDEIROS FILHO, S. Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Euterpe oleracea* Mart. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 3, p. 601-603, 2002.

LEITMAN, P.; MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. **Livro Vermelho da Flora do Brasil.**, p. 187- 195, 2013.

LUP, S. D.; TIAN, X.; XU, J.; PEREZ-PEREZ, J. M. Wound signalling of regenerative cell reprogramming. **Plant Science**, v. 250, p. 178-187, 2016.

MELLO, T.; ROSA, T. L. M.; SIMOES, I. M.; LIMA, P. A. M.; ANJOS, B. B.; ARAUJO, C. P.; HEGEDUS, C. E. N.; SANTOS, H. O.; OTONI, W. C.; ALEXANDRE, R. S.; LOPES, J. C. Reserve mobilization and *in vitro* germination of *Euterpe edulis* (Martius) seeds at different maturation stages. **Trees-Structure and Function**, v. 36, p. 415-426, 2022.

MELLO, T.; SILVA, T. D.; ZANARDO, T. E. C.; DE ALMEIDA, F. A. N.; OLIVEIRA, L. B.; HEGEDUS, C. E. N.; DOS ANJOS, B. B.; SCHMILDT, E. R.; FERREIRA, A.; DA SILVA FERREIRA, M. F.; LOPES, J. C.; DE FARIAS, V.; AQUIJE, G. M.; OTONI, W. C.; ALEXANDRE, R. S. Somatic embryogenesis in *Euterpe edulis* Martius is

improved by wounding, explant orientation, and suspension culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 156, n. 31, 2024a.

MELLO, T. D.; TALIULI, Y. D.; SILVA, T. D.; ZANARDO, T. E.; HEGEDUS, C. E.; ANJOS, B. B.; SCHMILDT, E. R.; FERREIRA, A.; LOURENÇO, M. P.; PINHEIRO, P. F.; AQUIJE, G. M.; LOPES, J. C.; OTONI, W. C.; ALEXANDRE, R. S. Optimization of somatic embryogenesis in *Euterpe edulis* Martius using auxin analogs and atomic force microscopy. **Scientia Horticulturae**, v. 331, p. 113164, 2024b.

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

MENDEZ-HERNANDEZ, H. A.; LEDEZMA-RODRÍGUEZ, M.; AVILEZ-MONTALVO, R. N.; JUAREZ-GOMEZ, Y. L.; SKEETE, A.; AVILEZ-MONTALVO, J.; DE-LA-PEÑA, C.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Signaling overview of plant somatic embryogenesis. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. 77 p. 2-15, 2019.

MISHRA, R.; JOSHI, R. K.; JHA, S. Review on abiotic stress induced alterations in photosynthetic efficiency and antioxidant defense system in plants. **Journal of Plant Physiology and Pathology**, v. 4, n. 3, p. 2-9, 2016.

MITTLER, R. ROS are good. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 1, p.11-19, 2017.

MORDHORST, A. P.; TOONEN, M. A. J.; VRIES, S. C. Plant embryogenesis. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 16, n. 8, p. 535-576, 1997.

MOREIRA, S. L. S.; PRATES JÚNIOR, P.; FERNANDES, R. B. A.; CUNHA, A. C. M. M.; CAMPOS, A. N. R. Growth and nutrients uptake in *Euterpe edulis* Martius inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 46, n.2, p. 169-176, 2016.

MOURA, E. F.; VENTRELLA, M. C.; MOTOIKE, S. Y.; SÁ JR., A. Q.; CARVALHO, M.; MANFIO, C. E. Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic

embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex. Martius). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 95, n. 2, p.175-184, 2008.

MOURA, E. F.; MOTOIKE, S. Y.; VENTRELLA, M. C.; SÁ, A. Q.; CARVALHO, M. Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. **Scientia Horticulturae**, v. 119, p. 447-454. 2009.

MURASHIGE, T. M.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NAMASIVAYAM, P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 90, p. 1-8, 2007.

NASCIMENTO, W. M. O.; CICERO, S. M.; NOVEMBRE, A. D. L. C. Conservação de sementes de açai (*Euterpe oleracea* Mart.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 1, p. 24-33, 2010.

NIC-CAN, G. I.; LOPEZ-TORRES, A.; BARREDO-POOL, F.; WROBEL, K.; LOYOLA-VARGAS, V. M.; ROJAS-HERRERA, R.; ESCOBEDO-GRACIA MEDRANO, R. M.; DE-LA-PEÑA, C. New insights into somatic embryogenesis: *LEAFY COTYLEDON1*, *BABY BOOM1*, and *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN4* are epigenetically regulated in *Coffea canephora*. **PLoS One**, v. 20, n. 8, p. 8-14, 2019.

NOLAN, E. K.; ROSE, J. R. Plant regeneration - somatic embryogenesis. In: DAVEY, M. R; ANTHONY, P. **Plant Cell Culture: Essential Methods**, c. 3, p. 40-59, 2007.

OLIVEIRA, L. B.; MELLO, T.; ARAUJO, C. P.; OLIVEIRA, J. P. B.; FERREIRA, A.; ZANARDO, T. E. C.; VIEIRA, L. M.; OTONI, W. C.; ALEXANDRE, R. S.; CARVALHO, V. S. Morphoanatomical aspects of auxin herbicides-induced somatic embryogenesis in *Euterpe edulis* Martius, a symbol and threatened species of the Atlantic Forest. **Scientia Horticulturae**, v. 299, p. 4-13, 2022.

PAIVA NETO, V. B.; GUERRA, M. P.; LAMBAIS, M. R.; KERBAUY, G. B. Advances in somatic embryogenesis of *Euterpe edulis* Martius and their implications for conservation. **Plant Cell Reports**, v. 37, n. 4, p. 675-686, 2018.

PANZA, V.; LAINEZ, V.; MALDONADO, S. Seed structure and histochemistry in the palm *Euterpe edulis*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 145, n. 4, p. 445-453, 2004.

PARAST, B. M.; CHETRI, S. K.; SHARMA, K.; AGRAWAL, V. In vitro isolation, elicitation of psoralen in callus cultures of *Psoralea corylifolia* and cloning of psoralen synthase gene. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, n. 10, p. 1138-1146, 2011.

PEREIRA, D. C. S.; GOMES, F. S.; TONON, R. V.; BERES, C.; CABRA, L. M. C. Towards chemical characterization and possible applications of juçara fruit: an approach to remove *Euterpe edulis* Martius from the extinction list. **Journal of Food Science Technology**, v. 60, p. 429- 440, 2022.

PEREZ-NUNEZ, M. T.; CHAN, J. L.; SAENZ, L.; GONZALEZ, T.; VERDEIL, J. L.; OROPEZA, C. Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) plumule explants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 42, p. 37-43, 2006.

PEREZ-PEREZ, Y.; ROJAS-HERNANDEZ, R. E.; GOMEZ-SILVA, L. Advances in plant tissue culture for the production of transgenic plants and secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 55, p. 107857, 2022.

PINTO, G.; SILVA, S.; LOUREIRO, J.; COSTA, A.; CELESTE, M.; CONCEIÇÃO, N.; ARAU, C. Acclimatization of secondary somatic embryos derived plants of *Eucalyptus globulus* Labill: an ultrastructural approach. **Trees - Structure and Function**, v. 25, p. 383-392, 2011.

PINTO, G.; SILVA, S.; PARK, Y.S.; NEVES, L.; ARAUJO, C.; SANTOS, C. Factors influencing somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globulus* Labill: basal medium and anti-browning agents. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 95, n. 1, p. 79-88, 2008.

PITZSCHKE, A.; FORZANI, C.; HIRT, H. Reactive oxygen species signaling in plants. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, n. 9-10, p. 1757-1764, 2006.

POSADA, F.; VEGA, F. E. Estabelecimento do entomopatógeno fúngico *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) como endófito em mudas de cacau (*Theobroma cacao*). **Micologia**, v. 97, p. 1195–1200, 2005.

R CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2024.

RAO, S. R.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 2, p. 101-153, 2002.

REE, J. F.; GUERRA, M. P. Palm (Arecaceae) somatic embryogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 51, n. 6, p. 589-602, 2015.

REIS, A.; KAGEYAMA, P. Y. Dispersão de sementes de *Euterpe edulis* Martius, Palmae. **Sellowia**, v. 49, n. 52, p. 60-92, 2000.

REIS, M. S.; CARVALHO, L. M.; FREITAS, R. S.; NOGUEIRA, F. C. Embriogênese somática em *Bactris gasipaes* para conservação. **Amazonian Journal of Plant Research**, v. 10, n. 4, p. 255-263, 2016.

RIBEIRO, M. S.; STEFFENS, C. A.; AMARANTE, C. V. T.; PIKART, T. G.; OLIVEIRA, L. M. Armazenamento de sementes de palmitero sob atmosfera modificada. **Bragantia**, v. 69, n. 4, p. 989-994, 2010.

ROSE, R. J.; MANTIRI, F. R.; KURDYUKOV, S.; CHEN, S. K.; WANG, X. D.; NOLAN, K. E.; SHEAHAN, M. B. Developmental biology of somatic embryogenesis. In: PUA, E. C.; DAVEY, M. R. (eds.). **Plant developmental biology biotechnological perspectives**. Springer-Verlag, Heidelberg, v. 2, p. 3-26, 2010.

SAENZ, L.; AZPEITIA, A.; CHUC-ARMENDARIZ, B.; CHAN, J. L.; VERDEIL, J. L.; HOCHER, V.; OROPEZA, C. Morphological and histological changes during somatic embryo formation from coconut plumule explants. **In Vitro Cellular Developmental Biology - Plant**, v. 42, p. 19-25, 2006.

SÁENZ, L.; HERRERA-HERRERA, G.; UICAB-BALLOTE, F.; CHAN, J. L.; OROPEZA, C. Influence of form of activated charcoal on embryogenic callus formation in coconut (*Cocos nucifera*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 100, p. 301-308, 2010.

SALDANHA, C. W.; MARTINS-CORDER, M. P.; STEINMACHER, D. A.; GUERRA, M. P. *In vitro* morphogenesis in zygotic embryos and leaf sheaths of *Euterpe edulis* Martius (Arecaceae). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 6, p. 228-235, 2006.

SALDANHA, C. W.; MARTINS-CORDER, M. P. *In vitro* germination and embryogenic competence acquisition of *Euterpe edulis* Martius immature zygotic embryos. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 171-178, 2012.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; GUEDES, R. S.; SILVA, R. A.; FERMINO JR., P. C. P.; LUIS, Z. G.; FREITAS, E. O. Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 109, p. 501-508, 2012.

SCHULZ, M.; SERAGLIO, S. K. T.; DE SOUZA, V. R.; SCHMIDT, C. G.; DANI, C.; PEREIRA, C. M. P. Bioactive compounds and health benefits of *Euterpe* palm fruits. **Trends in Food Science & Technology**, v. 49, p. 60-70, 2016.

SCHULZ, M.; BORGES, G. D. S. C.; GONZAGA, L. V.; COSTA, A. C. O.; FETT, R. Juçara fruit (*Euterpe edulis* Mart.): Sustainable exploitation of a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 89, p. 14-26, 2016.

SHARP, W. R.; SONDAHL, M. R.; CALDAS, L. S.; MARAFFA, S. B. The physiologic of *in vitro* asexual embryogenesis. **Horticultural Review**, v. 2, p. 268-310, 1980.

SILVA, I. S.; SANTANA, A. C.; REIS, M. S. Análise dos retornos sociais oriundos de adoção tecnológica na cultura do açai no Estado do Pará. **Ciência & Desenvolvimento**, v. 2, n. 3, p. 25-37, 2006.

SILVEIRA, V.; STEINMACHER, D. A.; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Influence of physical factors on somatic embryogenesis in *Euterpe edulis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 113, n. 1, p. 61-67, 2013.

SIMÕES, C.; FIGUEIREDO, A. G.; SCARIOT, V. M. Embriogênese somática direta e regeneração adventícia de brotos a partir de expantes de folhas de *Euterpe edulis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 108, n. 1, p. 59-66, 2012.

SOARES, J. S.; ROSA, Y. B.; SUZUKI, R. M.; SCALON, S. P.; ROSA JUNIOR, E. J. Cultivo in vitro de *Dendrobium nobile* com uso de água de coco no meio de cultura. **Horticultura Brasileira**, v. 31, p. 63–67, 2013.

SOUZA, C. M.; PINTO J. E. B. P.; RODRIGUES, B. M.; MORAIS, A. R.; ARRIGONIBLANK, M. F. Influência dos fatores físicos na regeneração de brotos em repolho. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 23, n. 4, p. 830-835, 1999.

SOUZA, G. F.; LIMA, A. R. A importância da família Arecaceae para a região norte. **EDUCamazônia**, v. 23, n. 2, p. 100-110, 2019.

SUGIMURA, Y.; SALVANA, M. J. Induction and growth of callus derived from rachilla explants of young inflorescences of coconut palm. **Canadian Journal of Botany**, v. 67, n. 1, p. 272-274, 1989.

STEINMACHER, D. A.; CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. **In Vitro Cellular Development Biology - Plant**, v. 43, n. 2, p. 124-132, 2007.

STEINMACHER, D. A.; KROHN, N. G.; DANTAS, A. C. M.; STEFENON, V. M.; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis in peach palm using the thin cell layer technique: Induction, morpho-histological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation. **Annals of Botany**, v. 100, n. 4, p. 699-709, 2007.

STEINMACHER, D. A.; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 89, n. 1, p. 15-22, 2007.

STEWART, F. C.; MAPES, M. O.; MEARS, K. Growth of organized development of culture cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. **American Journal of Botany**, v. 45, p. 704-708, 1958.

TEIXEIRA, J. B.; SONDAHL, M. R.; KIRBY, E. G. Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. **Plant Cell Reports**, v. 13, p. 247-250, 1994.

TYCZEWSKA, A.; GRACZ-BERNACIAK, J.; SZYMKOWIAK, J.; TWARDOWSKI, T. Herbicide stress-induced DNA methylation changes in two *Zea mays* inbred lines

differing in Roundup® resistance. **Journal of Applied Genetics**, v. 62, p. 235-248, 2021.

VALVERDE, R.; ARIAS, O.; THORPE, T. A. Picloram-induced somatic embryogenesis in pejobaye palm (*Bactris gasipaes* HBK). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 10, n. 2, p. 149-156, 1987.

VERDEIL, J. L.; HUET, C.; GROSDEMANGE, F.; BUFFARD-MOREL, J. Plant regeneration from cultured immature inflorescences coconut (*Cocos nucifera* L.): Evidence for somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v.13, p. 218-221, 1994.

VUTTIPONGCHAIKIJ, S.; JANTASURIYARAT, C. Genome-wide identification of homeodomain leucine zipper (HD-ZIP) transcription factor, expression analysis, and protein interaction of HD-ZIP IV in oil palm somatic embryogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, e. 5, p. 5000, 2023.

WENDT, T.; CRUZ, D. D.; DEMUNER, V. G.; GUILHERME, F. A. G.; BOUDET-FERNANDES, H. An evaluation of the species boundaries of two putative taxonomic entities of *Euterpe* (Arecaceae) based on reproductive and morphological features, **Flora**, v. 206, n. 2, p. 144-150, 2011.

YU, F.; FANG, P.; FANG, Y.; CHEN, D. Contributes to the growth and immune evasion of hepatocellular carcinoma via the miR-496/programmed cell death ligand 1 axis in an m6A-dependent manner. **Environmental Toxicology**, v. 39, n. 6, p. 3721-3733, 2024.

ZAVATTIERI, M. A.; FREDERICO, A. M.; LIMA, M.; SABINO, R.; ARNHOLDT-SCHMITT, B. Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2010.

ZAVATTIERI, M. A.; FALCÃO, V.; MAZZUCCO, E.; ARRUDA, M. S. P.; AZEVEDO, J. L.; DIAS, M. I. Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 3, p. 698-710, 2010.

ZHANG, S.; YAN, S.; NA, P.; CAO, Q.; WANG, C.; WANG, J.; ZHANG, H.; ZHANG, L. Embryogenic callus induction from immature zygotic embryos and genetic

transformation of *Larix kaempferi* 3x *Larix gmelinii* 9. **PLoS One**, v. 14, p. 16-26, 2021.

ZOUINE, J.; EL HADRAMI, I. Effect of 2,4-D, glutamine and BAP on embryogenic suspension culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 112, p. 221-226, 2007.