

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE GUEROBA [*Syagrus oleracea*
(Mart.) Becc.] COM ÊNFASE EM ASPECTOS ANATÔMICOS,
HISTOQUÍMICOS E ULTRAESTRUTURAIIS**

INAÊ MARIÊ DE ARAÚJO SILVA CARDOSO

**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**FACULDADE DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**FACULDADE DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL**

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE GUEROBA [*Syagrus oleracea*
(Mart.) Becc.] COM ÊNFASE EM ASPECTOS
MORFOANATÔMICOS, HISTOQUÍMICOS E
ULTRAESTRUTURAIIS**

INAÊ MARIÊ DE ARAÚJO SILVA CARDOSO

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira

COORIENTADOR: Prof. Dr. Anderson Marcos de Souza

Tese apresentada à Universidade de Brasília para obtenção do título de Doutora em Ciências Florestais, área de concentração: Manejo florestal, subárea de concentração: Biotecnologia florestal (Cultura de tecidos de plantas).

**BRASÍLIA - DF
FEVEREIRO DE 2018**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS

“EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE GUEROBA [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] COM
ÊNFASE EM ASPECTOS ANATÔMICOS, HISTOQUÍMICOS E
ULTRAESTRUTURAIS”

INAÊ MARIÊ DE ARAÚJO SILVA

TESE DE DOUTORADO ACADÊMICO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS, DO DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL, DA FACULDADE DE TECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR.

APROVADA POR:

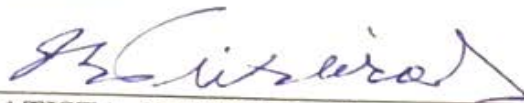


Prof. Dr. JONNY EVERSON SCHERWINSKI PEREIRA (Empresa Brasileira de Pesquisa agropecuária – Embrapa);
(Orientador)

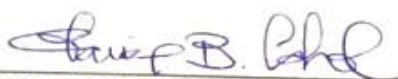


Prof. Dr. MAURO ELOI NAPPO (Departamento de Engenharia Florestal – EFL/UnB);
(Examinador Interno)

Prof. Dr. SUELI MARIA GOMES (Departamento de Botânica – BOT/UnB)
(Examinador Externo)



Dr. JOÃO BATISTA TEIXEIRA (Empresa Brasileira de Pesquisa agropecuária – Embrapa)
(Examinador Externo)



Dr. GLÁUCIA BARBOSA CABRAL (Empresa Brasileira de Pesquisa agropecuária – Embrapa).
(Examinador Suplente)

Brasília-DF, 28 de fevereiro de 2018.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente, com os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

dPPGEFL de Araújo Silva Cardoso, Inaê Mariê
.DM EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE GUEROBA [Syagrus oleracea
085/201 (Mart.) Becc.] COM ÊNFASE EM ASPECTOS ANATÔMICOS,
8e HISTOQUÍMICOS E ULTRAESTRUTURALS / Inaê Mariê de Araújo
Silva Cardoso; orientador Jonny Everson Scherwinski
Pereira; co-orientador Anderson Marcos de Souza . --
Brasília, 2018.
359 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Ciências Florestais) --
Universidade de Brasília, 2018.

1. Arecaceae. 2. Micropropagação. 3. Auxinas. 4.
Histologia. 5. Microscopia Eletrônica de Transmissão. I.
Everson Scherwinski-Pereira, Jonny, orient. II. Marcos de
Souza, Anderson, co-orient. III. Título.

Ofereço

Aos meus pais, Diva e Anselmo, minha vida

À minha irmã, Morgana, meu presente de Deus

Ao meu marido, Rodrigo, meu grande amor e parceiro

Dedico

À minha vovó, Joaquina, minha grande incentivadora

“A ti, que habitas nos céus, elevo os olhos!”

(Salmos 123: 1)

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Ao Senhor Jesus pela definição de cada detalhe da minha vida e pela opção de escolha de cada um deles.

À minha abençoada família, minha Diva, pai Anselmo, Morguinha, vovó Joaninha, meu marido Rodrigo, as minhas razões de viver, os motivos da minha luta diária, meus grandes amores!! A dona Sely, seu Geraldo e Ricardo, minha família do Goiás. A meu tio Nilton, o cara da gueroba!

Ao meu orientador, Jonny Everson Scherwinski-Pereira, que me acolheu como aluna de pós-graduação em seu laboratório, me orientou e me auxiliou de todas as formas possíveis para que me tornasse uma doutora! Um grande orientador!!

Ao prof. Anderson Marcos de Souza, pelas portas abertas.

A todos, absolutamente, todos meus amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos II (LCT II), mais uma família que conquisto na vida. Em especial, a Zanderluce Gomes que me acolheu e me inseriu dentro dessa família, ao Filipe Satlher, parceiro de longas horas de micrótomo e de risadas, e ao André Xavier de Souza, pela prontidão e paciência ao longo desses anos de trabalho.

À Ana Cristina Gomes, pelo carinho, paciência e ensinamentos referentes à microscopia.

À EMBRAPA e à UnB (Departamento de Engenharia Florestal), instituições cuja parceria permitiu que esse trabalho fosse realizado. À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

A todos, absolutamente, todos que em oração ou fisicamente me fortaleceram nessa jornada!!! **Meu coração é imensamente grato a todos vocês!!!**

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Distribuição geográfica de *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc. no território brasileiro. Fontes: Henderson, Galeano, Bernal (1995), Nascente, Peixoto e Santos (2000) e Lorenzi et al. (2010).....13

Figura 2. Aspectos gerais da palmeira *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc. A: Indivíduo adulto no campo exibindo estipe cilíndrico simples e folhas adultas dispostas em forma de espiral e moderadamente arqueadas. B: Plantio de gueroba para coleta de frutos. C: Indivíduo com bráctea fechada contendo inflorescência imatura no seu interior. D: Indivíduo com inflorescência interfoliar pós abertura (envolvida por bráctea) e frutos verdes.17

Figura 3. Exploração econômica da palmeira *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc. A: Área de plantio para extração de palmito com plantas com diferentes idades. B: Produtos cosméticos derivados de frutos de gueroba. C, D: Palmito não processado comercializado em feiras locais do interior do estado do Goiás – Brasil. E: Comercialização do palmito processado em supermercado.....20

Figura 4. Lista de espécies de palmeiras com protocolos de embriogênese somática publicados. Adaptado de Ree e Guerra (2015).....22

Figura 5. Diagrama esquemático das vias da embriogênese somática *in vitro*. Adaptado de Fehér (2015) e Rose (2016).25

CAPÍTULO II

Figura 1. Semente e embrião zigótico de gueroba (*Syagrus oleracea*) (A-C, morfologia; D-I, anatomia). A: Semente. B, C: Embrião zigótico. D: Secção transversal do embrião zigótico e endosperma. E: Células do endosperma. F: Secção longitudinal do embrião zigótico (F1-F6: secções atômicas transversais). G: Plúmula. H: Provável estômato. I: Procâmbio e protoderme. Abreviações: (ee) eixo embrionário, (end) endosperma, (est) estômato, (ez) embrião zigótico, (f) fenda cotiledonar, (inv) invaginação, (mf) meristema fundamental, (pc) procâmbio, (pf) primórdio foliar, (pl) plúmula, (pmc) promeristema caulinar, (pmr) promeristema radicular, (pt) protoderme, (rd) região distal e (rp) região proximal. Barras = A: 5 mm; B, C: 1 mm; F: 500 µm; D: 200 µm; G-I: 50 µm e E: 20 µm.....94

Figura 2. Histoquímica do endosperma e de um embrião zigótico de gueroba (*Syagrus oleracea*). A: Endosperma com corpos proteicos identificados com *Xylidine Ponceau*. B: Endosperma com possíveis glicoproteínas coradas com *Periodic Acid Schiff*. C: Células do endosperma com corpos lipídicos visualizados com Sudan III (material fresco). D: Corpos proteicos em células do cotilédone. E: Corpos proteicos em células adjacentes aos cordões procambiais (seta). F: Grãos de amido em células da plúmula (seta). G: Grãos de amido em células do cotilédone (seta). H, I: Corpos lipídicos em células do procâmbio e cotilédone, respectivamente. Abreviações: (pc) procâmbio e (pf)

primórdio foliar. Barras = B, D, F, I: 50 μm e A, C, E, G, H: 20 μm .
.....95

Figura 3. Caracterização ultraestrutural de células de embriões zigóticos de gueroba (*Syagrus oleracea*) não inoculados (tempo 0 dias). A: Célula do meristema fundamental com núcleo proeminente e reservas proteicas e lipídicas; observar aspecto anatômico (quadrado lateral). B: Núcleo envolto por corpos lipídicos. C: Corpos proteicos, corpos lipídicos e espaço intercelular. C: Paredes celulares com plasmodesmos (setas). E: Célula do meristema fundamental com núcleo proeminente, vacúolo adjacente à parede celular e reservas proteicas e lipídicas. Abreviações: (cl) corpo lipídico, (cp) corpo proteico, (ei) espaço intercelular, (n) núcleo, (mf) meristema fundamental, (p) parede celular, (pc) procâmbio e (v) vacúolo. Barras = A, E, F: 2 μm e B-D: 0,5 μm 96

Figura 4. Embrião zigótico de gueroba (*Syagrus oleracea*) aos 7 dias em meio de indução de embriogênese somática (13,57 μM de 2,4-D). A: Embrião zigótico com leve intumescimento. B: Secção anatômica longitudinal do embrião zigótico mencionado na letra A; notar limite (linha pontilhada) entre células embriogênicas e não embriogênicas. C: Secção transversal de embrião zigótico com leve intumescimento; notar áreas reativas (*). D-F: Áreas reativas (com células embriogênicas). G: Células embriogênicas coradas com Calcoflúor White com divisões em diferentes planos. H: Grãos de amido corados com Lugol e *Periodic Acid Schiff* (PAS), respectivamente, localizados acima do promeristema radicular. I: Células-guardas com grãos de amido. J: Grãos de amido corados com PAS observados na região haustorial. K-M: Corpos proteicos corados com *Xylidine Ponceau* (XP) localizados nas proximidades do eixo embrionário. N: Corpos proteicos corados com XP localizados nas proximidades do procâmbio. Abreviações: (ce) célula embriogênica, (cne) célula não embriogênica, (ee) eixo embrionário, (est) estômato, (pc) procâmbio e (pl) plúmula. Barras = A: 2 mm; B: 500 μM ; C, H, K: 200 μM ; D-F, N: 50 μM ; I, J, L, M: 20 μM e G: 10 μM 99

Figura 5. Caracterização ultraestrutural de células não embriogênicas e células embriogênicas de gueroba (*Syagrus oleracea*) aos 7 dias em meio de indução da embriogênese somática (13,57 μM de 2,4-D). A: Ultraestrutura de célula não embriogênica do meristema fundamental aos 7 dias em meio de indução; notar citoplasma pouco denso, ausência de nucléolo e caracterização anatômica (quadrado lateral). B: Detalhe da letra A com vacúolo, corpos lipídicos e espaço intercelular evidentes. C: Célula não embriogênica com corpos lipídicos. D: Célula não embriogênica com vacúolos de tamanhos variados e corpos lipídicos. E: Células não embriogênicas com grãos de amido. F: Detalhe da letra E evidenciando reservas polissacarídicas e lipídicas. G: Células não embriogênicas com gotas eletrodensas de natureza desconhecida (seta). H: Célula não embriogênica com corpos lipídicos distribuídos nas proximidades do envelope nuclear e das membranas plasmáticas. I: Detalhe de corpos lipídicos. J: Ultraestrutura de célula embriogênica do meristema fundamental (região proximal) aos 7 dias em meio de indução; notar citoplasma denso, parede celular espessa e caracterização anatômica (quadrado lateral). K: Detalhe de núcleo com membrana irregular, nucléolo evidente e domínios de heterocromatina na periferia do envelope nuclear. L: Célula embriogênica com citoplasma rico em mitocôndrias. M: Detalhe de retículo endoplasmático (setas) e Complexo de Golgi. N: Célula embriogênica com citoplasma rico em organelas (mitocôndrias e retículos endoplasmáticos); notar retículo endoplasmático concêntrico (quadrado). O: Detalhe de vesículas eletrodensas partindo da membrana plasmática para apoplasto. P: Detalhe de amiloplasto. Q: Detalhe de plasmodesmos (setas). R: Detalhe de espaço intercelular.

Abreviações: (a) amido, (cl) corpo lipídico, (cg) complexo de Golgi, (ei) espaço intercelular, (hc) heterocromatina, (m) mitocôndria, (n) núcleo, (nu) nucléolo, p (proteína), (re) retículo endoplasmático, (v) vacúolo e (ve) vesícula. Barras = C, E, G, H, J: 2 µm; A, D, K, L, N: 1 µm; B, F, I, M, P, R: 0,5 µm e O, Q: 0,2 µm. 103

Figura 6. Caracterização anatômica, histoquímica e ultraestrutural de células de embriões zigóticos de gueroba (*Syagrus oleracea*) no tempo 0 (não inoculados) e aos 7 dias em meio de indução de embriogênese somática (13,57 µM de 2,4-D), com ênfase nos compostos de reserva. A: Secção anatômica de célula do meristema fundamental de embrião zigótico não inoculado. B: Célula do meristema fundamental (região distal) de embrião zigótico não inoculado corada com *Periodic Acid Schiff* (PAS), sem grãos de amido evidentes. C: Célula do meristema fundamental de embrião zigótico não inoculado, com corpos proteicos conspícuos corados com *Xylidine Ponceau* (XP). D: Ultraestrutura de célula do meristema fundamental de embrião zigótico não inoculado com reservas proteicas e lipídicas. E: Detalhe da letra D evidenciando corpos proteicos floculentos e corpos lipídicos. F: Detalhe da letra D e E evidenciando corpos lipídicos. G: Secção anatômica de célula não reativa (não embriogênica) do meristema fundamental aos 7 dias em meio de indução. H: Grãos de amido (seta) em células não reativas do meristema fundamental aos 7 dias em meio de indução. I: Resquícios de proteína (seta) em células não reativas do meristema fundamental aos 7 dias em meio de indução. J: Ultraestrutura de célula não reativa do meristema fundamental aos 7 dias em meio de indução; notar citoplasma pouco denso. K: Detalhe da letra J evidenciando grãos de amido ao redor do núcleo. L: Detalhe da letra J evidenciando resquícios proteicos e corpos lipídicos. M: Secção anatômica de célula reativa (embriogênica) do meristema fundamental aos 7 dias em meio de indução. N: Grãos de amido (seta) em células reativas do meristema fundamental aos 7 dias em meio de indução. O: Corpos proteicos definidos (seta) e resquícios proteicos em células reativas do meristema fundamental aos 7 dias em meio de indução. P: Ultraestrutura de célula reativa do meristema fundamental aos 7 dias em meio de indução; notar citoplasma denso com pequenos vacúolos. Q: Detalhe da letra P evidenciando grãos de amido. R: Detalhe da letra Q evidenciando vacúolos com proteína. Abreviações: (a) amido, (cl) corpo lipídico, (cp) corpo proteico, (p) proteína, (rp) resquício proteico e (v) vacúolo. Barras = B: 50 µM; G, H, M: 25 µM; A, C, I, N, O: 20 µM; D, P: 2 µM; J, Q, R: 1 µM e E, F, K, L: 0,5 µM. 105

Figura 7. Embrião zigótico de gueroba (*Syagrus oleracea*) aos 14 dias em meio de indução de embriogênese somática (13,57 µM de 2,4-D). A: Embrião zigótico com nódulos pequenos, compactos e translúcidos sobre a região distal (seta). B: Secção anatômica longitudinal do embrião zigótico mencionado na letra A; notar células em divisão celular (quadrado lateral correspondente ao quadrado com borda preta). C: Células protodérmicas e subprotodérmicas em divisão celular (início de protuberância). D: Magnificação da região proximal. E: Células embriogênicas com paredes celulares com calose identificada por corante Azul de Anilina. F: Células embriogênicas com padrão de divisão predominantemente em sentido periclinal; magnificação da região delimitada pelo retângulo com borda branca (letra B). G: Corante Calcoflúor White ratifica a ocorrência de divisões preferencialmente em sentido periclinal. H: Células embriogênicas com padrão de divisão predominantemente em sentido periclinal sem presença de calose (células coradas com Azul de Anilina). I: Magnificação de protuberância com células meristemáticas. J: Corante Calcoflúor White evidencia células de protuberância com células em divisão em diferentes planos. K: Proembriões;

notar espessamento das paredes celulares externas (setas). L: Proembriões com células em divisão em diferentes planos, conforme Calcoflúor White; notar espessamento das paredes celulares externas (setas). M, N: Células em intensa atividade mitótica nas proximidades dos elementos vasculares, em diferentes planos de divisão (setas). Abreviações: (ce) célula embriogênica, (cm) célula meristemática, (ee) eixo embrionário, (ev) elemento de vaso e (pc) procâmbio. Barras = A: 2 mm; B: 500 μ M; C: 200 μ M; E, I, M: 50 μ M; F, J, K, N: 20 μ M e D, G, H, L: 10 μ M. 110

Figura 8. Caracterização anatômica e ultraestrutural de células embriogênicas, células meristemáticas (protuberâncias) e proembriões obtidos a partir de embriões zigóticos de gueroaba (*Syagrus oleracea*) estes dois últimos observados aos 14 dias em meio de indução. A: Secção anatômica de células embriogênicas aos 7 dias em meio de indução de embriogênese somática (13,57 μ M de 2,4-D). B: Ultraestrutura de célula embriogênica aos 7 dias em meio de indução; notar citoplasma denso, núcleo central com formato irregular e nucléolo solitário, grãos de amido conspícuos, parede celular mais espessa (setas) e espaço intercelular proeminente. C: Secção anatômica de protuberância aos 14 dias em meio de indução de embriogênese somática (13,57 μ M de 2,4-D) com células meristemáticas. D: Ultraestrutura de célula meristemática localizada no interior de protuberância; observar citoplasma denso, núcleo central com dois nucléolos, parede celular fina (seta) e ausência de espaços intercelulares. E: Citoplasma de célula meristemática com mitocôndrias, retículos endoplasmáticos e inúmeros ribossomos (círculo). F: Secção anatômica de proembriões aos 14 dias em meio de indução de embriogênese somática (13,57 μ M de 2,4-D) com células meristemáticas. G: Ultraestrutura de proembriões; notar espaços intercelulares. H: Ultraestrutura de proembrião; notar parede celular externa mais espessa (seta branca) que as paredes celulares internas (seta preta). I: Célula meristemática observada no interior de proembrião com evidentes domínios de heterocromatina e plastídeos com poucos grãos de amido ou desprovidos deles. J: Célula meristemática observada no interior de proembrião, com citoplasma composto por mitocôndrias e retículos endoplasmáticos; observar retículo endoplasmático concêntrico. K: Plastídeos com poucos grãos de amido visualizados no interior de célula meristemática; notar núcleo com parede irregular. Abreviações: (a) amido, (ce) célula embriogênica, (cm) célula meristemática, (ei) espaço intercelular, (hc) heterocromatina, (m) mitocôndria, (n) núcleo, (nu) nucléolo, (p) plastídeo, (pe) proembrião, (r) ribossomo, (re) retículo endoplasmático, (rp) resquício proteico e (v) vacúolo. Barras = C: 50 μ M; A, F: 20 μ M; G: 5 μ M; B, D: 2 μ M; K: 1 μ M e E, H-J: 0,5 μ M.....111

Figura 9. Caracterização histoquímica de embrião zigótico de gueroaba (*Syagrus oleracea*) aos 14 dias em meio de indução de embriogênese somática (13,57 μ M de 2,4-D). A: Grãos de amido (corados com *Periodic Acid Schiff* - PAS) observados em células reativas localizadas imediatamente acima do promeristema radicular e ao redor do eixo embrionário. B: Grãos de amido (corados com Lugol) observados em células reativas localizadas imediatamente acima do promeristema radicular. C: Grãos de amido observados em área em intensa divisão celular. D: Células embriogênicas localizadas na região proximal com resquícios proteicos corados com *Xylidine Ponceau* (XP). E: Células embriogênicas com citoplasma denso, intensamente coradas com XP. F: Pectinas identificadas nos espaços localizados entre os proembriões, com corante Vermelho de Rutênio (seta). G-I: Barreira fenólica identificada pelos corantes Azul de Toluidina, Dicromato de Potássio e Azul de Anilina, respectivamente, entre células

embriogênicas e não embriogênicas. Abreviações: (cf) composto fenólico e (v) vacúolo. Barras = A: 200 µM; B, G: 50 µM; C-F, H: 20 µM e I: 10 µM..... 113

Figura 10. Embrião zigótico de gueroaba (*Syagrus oleracea*) aos 21 dias em meio de indução de embriogênese somática (13,57 µM de 2,4-D). A: Embrião zigótico com massa calogênica mucilaginosa sobre a extremidade proximal (seta) e desenvolvimento de estruturas nodulares localizadas sobre região distal. B: Secção anatômica longitudinal do embrião zigótico mencionado na letra A; notar protoderme reativa (retângulo lateral). C: Magnificação da região proximal. D: Células embriogênicas em intensa divisão celular localizadas na região proximal. E: Protuberância com células meristemáticas. F: Proembriões. G: Proembriões com células em divisão diferentes planos, conforme Calcoflúor White. H-K: Barreira fenólica identificada pelos corantes Azul de Toluidina, Dicromato de Potássio e Azul de Anilina, respectivamente, entre células embriogênicas e não embriogênicas. L: Grãos de amido (corados com *Periodic Acid Schiff* - PAS) observados em células vacuoladas localizadas na extremidade proximal; grãos de amido corados com Lugol (quadrado lateral). M: Grãos de amido observados em área em intensa divisão celular. N: Células embriogênicas localizadas na região proximal com resquícios proteicos corados com *Xylidine Ponceau* (XP). Abreviações: (ce) célula embriogênica, (cf) composto fenólico, (cm) célula meristemática, (ee) eixo embrionário, (pc) procâmbio e (pe) proembrião. Barras = A: 2 mm; B: 500 µM; C, H: 200 µM; D, E, G, K, L, M: 50 µM; J: 25 µM; I, N: 20 µM e F: 10 µM.. 116

Figura 11. Embrião zigótico de gueroaba (*Syagrus oleracea*) aos 30 dias em meio de indução de embriogênese somática (13,57 µM de 2,4-D) e embriões somáticos originados a partir destes. A: Embrião zigótico com massa calogênica mucilaginosa sobre a extremidade proximal (seta) e embriões somáticos sobre as regiões mediana (colchete) e distal. B: Secção anatômica longitudinal do embrião zigótico mencionado na letra A; notar embrião somático com protoderme fechada (retângulo). C: Magnificação de embrião somático com protoderme fechada. D: Detalhe de protoderme do embrião somático mencionado anteriormente. E: Embriões somáticos de origem direta e multicelular. F: Embrião somático com células em divisão em diferentes planos (corado com Calcoflúor White). G: Massas meristemáticas volumosas nas adjacências dos elementos de vaso. H: Proembriões comprimindo células não reativas; observar barreira fenólica. I: Barreira fenólica identificada por Dicromato de Potássio entre células embriogênicas e não embriogênicas. J: Células embriogênicas e proembriões com paredes celulares com calose identificada por Azul de Anilina; notar barreira fenólica. K: Grãos de amido (corados com Lugol) localizados na extremidade proximal e acima do promeristema radicular. L: Grãos de amido (corados com *Periodic Acid Schiff* - PAS) localizados nas laterais dos feixes procambiais. N: Embrião somático desprovido de corpos proteicos conforme corante *Xylidine Ponceau* (XP). Abreviações: (cf) composto fenólico, (es) embrião somático, (mm) massa meristemática, (pe) proembrião e (pt) protoderme. Barras = A: 2 mm; B: 500 µM; C, E: 200 µM; D, G, H, J, L, M, N: 50 µM e F, I: 20 µM. 119

Figura 12. Embrião zigótico de gueroaba (*Syagrus oleracea*) aos 60 dias em meio de indução de embriogênese somática (13,57 µM de 2,4-D) e embriões somáticos originados a partir destes. A: Embrião zigótico com massa calogênica mucilaginosa sobre a extremidade proximal (seta) e embriões somáticos sobre as regiões mediana e distal (colchetes). B: Secção anatômica longitudinal do embrião zigótico mencionado na letra A; notar embriões somáticos com protoderme fechada. C: Provável início de

embriogênese secundária (seta). D, E: Barreira fenólica identificada por Azul de Toluidina e Dicromato de Potássio. F: Células embriogênicas e proembriões com paredes celulares com calose identificada por Azul de Anilina; notar barreira fenólica. G: Grãos de amido (corados com *Periodic Acid Schiff* - PAS) visualizados em embrião somático. H: Embrião somático desprovido de corpos proteicos de acordo com *Xylidine Ponceau* (XP). Abreviações: (cf) composto fenólico, (es) embrião somático e (pt) protoderme. Barras = A: 1 mm; B, D: 500 μM ; C, E, G, H: 50 μM e F: 20 μM 121

Figura 13. Caracterização anatômica e ultraestrutural de células de embriões somáticos globulares de gueroba (*Syagrus oleracea*) obtidos a partir de embriões zigóticos após 60 dias em meio de indução de embriogênese somática (13,57 μM de 2,4-D). A: Secção anatômica de embrião somático globular. B: Células vacuoladas localizadas na protoderme em formação. C: Células com citoplasmas densos; notar núcleos evidentes com fragmentos de heterocromatina. D: Detalhe de célula com alta relação núcleo/citoplasma; notar grãos de amido. E: Gota eletrodensa (seta) de natureza desconhecida. F: Detalhe de célula com complexos de Golgi evidentes, pequenos grãos de amido e gota eletrodensa de natureza desconhecida (seta). Abreviações: (a) amido, (cg) complexo de Golgi, (es) embrião somático, (hc) heterocromatina, (m) mitocôndria, (n) núcleo, (pt) protoderme, (re) retículo endoplasmático e (v) vacúolo. Barras = A: 500 μm ; B, C: 2 μm ; D: 1 μm e E, F: 0,5 μm119

Figura 14. Embrião zigótico de gueroba (*Syagrus oleracea*) aos 90 dias em meio de indução de embriogênese somática (13,57 μM de 2,4-D). A: Embrião zigótico envolto por calo. B: Secção anatômica longitudinal da região distal do embrião zigótico mencionado na letra A; notar rompimento de vários pontos da protoderme com consequente liberação de massas calogênicas (seta). C: Calo formado por células internas com citoplasma denso e células externas vacuoladas. D: Protoderme com células embriogênicas. E: Células não reativas do embrião zigótico sendo comprimidas; notar possíveis proembriões com células vacuoladas (seta). F: Protoderme rompida com liberação de possíveis proembriões com células vacuoladas (seta). G: Células embriogênicas isoladas. H, I: Embriões somáticos de provável origem unicelular. J: Embrião somático de provável origem multicelular. K: Detalhe da protoderme do embrião somático mencionado na letra J. L, M: Grãos de amido na periferia de calo composto predominantemente por células vacuoladas, corados com *Periodic Acid Schiff* (PAS) e Lugol, respectivamente. N: Células embriogênicas com corpos proteicos corados com *Xylidine Ponceau* (XP). Abreviações: (ce) célula embriogênica, (cnr) célula não reativa, (cv) células vacuoladas, (es) embrião somático, (mc) massa calogênica e (pt) protoderme. Barras = A: 2 mm; B: 500 μM ; J, K: 200 μM ; C-H, L-N: 50 μM e I: 20 μM 125

Figura 15. Embrião zigótico de gueroba (*Syagrus oleracea*) aos 120 dias em meio de indução de embriogênese somática (13,57 μM de 2,4-D) com massa calogênica. A: Embrião zigótico com massa calogênica mucilagínosa sobre a região proximal (seta) e massa calogênica sem formato definido, com bordas irregulares e consistência compacta localizada na extremidade da região distal (retângulo). B: Secção anatômica longitudinal da extremidade da região distal do explante mencionado na letra A; notar arranjos protodérmicos (seta, retângulo lateral) e compostos fenólicos. C: Células embriogênicas observadas nas periferias dos calos. D: Regiões protodérmicas soltas, formando estruturas semelhantes a cordões; notar elementos de vaso. E: Regiões protodérmicas soltas com células vacuoladas. F: Regiões protodérmicas soltas com

células embriogênicas. G: Calose observada em células localizadas nas proximidades de uma região rica em compostos fenólicos. H: Calose visualizada em células periféricas. I: Resquílios proteicos em células subprotodérmicas (seta) corados com *Xylidine Ponceau* (XP). Abreviações: (ce) célula embriogênica, (cf) composto fenólico, (ev) elemento de vaso e (pt) protoderme. Barras = A: 1 mm; B, D: 500 µM; C, E, F: 50 µM; G, H: 20 µM e I: 10 µM. 128

Figura 16. Embrião zigótico de gueroba (*Syagrus oleracea*) aos 120 dias em meio de indução de embriogênese somática (13,57 µM de 2,4-D) sem reação. A: Aspecto morfológico de embrião zigótico sem reação. B: Secção anatômica longitudinal do embrião zigótico mencionado na letra A. C, D: Células não embriogênicas. E, F: Grãos de amido (corados com *Periodic Acid Schiff* - PAS) localizados sobre os primórdios foliares e imediatamente acima do eixo embrionário, respectivamente. G: Resquílios proteicos (corados com *Xylidine Ponceau* - XP) em células da região distal (seta). Barras = A: 1 mm; B: 500 µM e C-G: 50 µM. 129

Figura 17. Embriogênese somática direta a partir de embriões zigóticos de *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc. (gueroba). A via embriogênica é iniciada a partir da exposição de células de embriões zigóticos maduros à alta concentração da auxina 2,4-D e a outros estresses inerentes ao cultivo *in vitro*, que caracterizam as condições permissivas para que a embriogênese ocorra. Células pré-embriogenicamente determinadas (terminologia de Sharp *et al.*, 1980/ Williams e Maheswaran, 1985) localizadas, sobretudo, na protoderme e subprotoderme dos embriões, sob a influência dessas condições permissivas, principalmente, do 2,4-D, sofrem uma redeterminação mínima (reprogramação gênica mínima) e tornam-se embriogênicas ou *stem cells* totipotentes (modificações ultraestruturais coincidentes com o relatado por Verdeil *et al.* 2007). Uma vez totipotentes, essas células sofrem divisões celulares que dão origem à proembriões (construções de origem unicelular) e à protuberâncias, as quais, posteriormente, evoluem para embriões somáticos globulares de origem multicelular. Protuberâncias e proembriões exibem células meristemáticas (paredes celulares delgadas, presença predominante de dois nucléolos ou ausência de nucléolo definido – heterocromatina irregular, amiloplastos com grãos de amido ou desprovidos de grãos de amido). Proembriões formados a partir da divisão de células localizadas mais próximas do meio de cultivo são envoltos por compostos fenólicos (barreira fenólica visualizada entre células embriogênicas e/ou proembriões e células não embriogênicas). Dentre outras hipóteses, acredita-se que essa barreira fenólica observada, provavelmente, possui função protetiva contra às altas concentrações de 2,4-D inerentes à proximidade com meio de cultivo. 149

CAPÍTULO III

Figura 1. Esquema para a obtenção de explantes de plantas de gueroba [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] cultivadas *in vitro*. 176

Figura 2. Efeito das auxinas Picloram e 2,4-D (450 µM) na percentagem de oxidação, de formação de calos primários e de calos embriogênicos durante a embriogênese somática em gueroba (*Syagrus oleracea*), a partir de segmentos foliares de plantas germinadas *in vitro*. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam o erro padrão. 188

Figura 3. Evolução morfológica do calo primário a embriões somáticos de gueroba (*Syagrus oleracea*), a partir de segmento foliar de planta jovem germinada *in vitro*, em meio com Picloram. A: Calos primários translúcidos, com consistência mucilagínosa, verificados sobre explante basal (primeiro explante), após 30 dias em meio de indução. B-E: Desenvolvimento de estruturas nodulares compactas, brilhosas e com superfície lisa (calos embriogênicos) após 60, 150, 180 e 240 dias, respectivamente, em meio de indução. F: Desenvolvimento da massa embriogênica após 90 dias em meio de diferenciação. G, H: Calos com características embriogênicas e embriões somáticos em fase semelhante a globular após 150 dias em meio de diferenciação. I: Embriões somáticos e estrutura esponjosa semelhante a um haustório (seta) intumescido de embrião zigótico observados após 150 dias em meio de diferenciação. J: Calos embriogênicos e embriões somáticos após 240 dias em meio de diferenciação. K: Individualização de embriões somáticos (seta) após 240 dias em meio de diferenciação. L: Alongamento de embriões somáticos (linha pontilhada) após 240 dias em meio de diferenciação. Abreviações: (ce) calo embriogênico e (es) embrião somático. Barras = B: 1 mm e A, C-L= 2 mm.....190

Figura 4. Diferentes respostas de explantes em meio de regeneração. A: Massa haustorial verde e embriões somáticos brancos (quadrado). B: Rizogênese. C: Germinação anormal (emissão de parte aérea fusionada com massa calogênica). Abreviações: cp (calo primário), (ha) haustório e (pa) parte aérea. Barras = A, B: 3 cm e C: 2 mm.192

Figura 5. Caracterização morfoanatômica e histoquímica de folhas imaturas de plantas jovens germinadas *in vitro* de gueroba (*Syagrus oleracea*) e da formação de calos a partir desses explantes. A: Aspecto externo de segmento de folha imatura de gueroba. B: Secção transversal de segmento de folha imatura de gueroba não submetida ao tratamento com regulador de crescimento; notar feixes vasculares e células do mesofilo diferenciadas. C: Feixe vascular de maior calibre. D: Feixe vascular de calibre intermediário e detalhe de idioblasto (seta). E: Secção transversal de segmento de folha imatura de gueroba aos 40 dias em meio de indução, com desorganização do parênquima (perivascular e vascular) e proliferação celular nas adjacências dos feixes vasculares. F: Detalhe da secção mencionada na letra E, evidenciando uma nova população de células com características meristemáticas (seta) e *clusters* de células (pontilhados) com nítidos espaços intercelulares (*). G: Proliferação celular nas adjacências de elementos traqueais. H: Calo primário na quina do explante, aos 40 dias em meio de indução. I, J: Proliferação celular nas adjacências do feixe vascular. K: Calo embriogênico. L: Secção anatômica de calo embriogênico com zona meristemática periférica rica em grãos de amido (quadrado). M: Detalhe da secção mencionada na letra L, que evidencia intensa divisão celular, principalmente, no sentido periclinal (pontilhado). Abreviações: (cp) células parenquimáticas, (cm) células meristemáticas, (ep) epiderme, (fi) fibra – células esclerenquimáticas, (fl) floema, (fv) feixe vascular, (id) idioblasto, (ng) nervura de grande calibre, (ni) nervura de calibre intermediário, (np) nervura de pequeno calibre e (x) xilema. Barras = A, K: 1 mm; H: 2 mm; B, E, I, L: 500 µm e C, D, F, G, J, M: 50 µm.....195

Figura 6. Caracterização morfoanatômica e histoquímica de embriões somáticos de gueroba (*Syagrus oleracea*), provenientes de folhas imaturas de planta jovem germinada *in vitro*. A: *Cluster* de embriões somáticos globulares. B: Secção anatômica de *cluster* de embriões somáticos globulares. C: Detalhe anatômico da secção mencionada na letra B, evidenciando prováveis promeristemas em formação (quadrado). D: Detalhe da

protoderme. E: Detalhe de provável promeristema caulinar. F, G, H: Corpos proteicos identificados com corante *Xylidine Ponceau* - XP (quadrado, seta). Abreviações: (ce) calo embriogênico, (es) embrião somático, (pmc) promeristema caulinar, (pmr) promeristema radicular e (pt) protoderme. Barras = A: 2 mm; B: 500 µm; D, E: 50 µm; C, F: 200 µm e G, H: 20 µm.....198

Figura 7. Aspectos morfoanatômicos e histoquímicos de calo friável obtido a partir de segmentos foliares de plantas jovens germinadas *in vitro* de gueroba (*Syagrus oleracea*). A: Calo friável. B: Secção anatômica de calo friável. C: Detalhe da secção mencionada na letra B, que evidencia células com citoplasmas densos, núcleos grandes e vacúolos fragmentados. D: Secção anatômica de calo friável evidenciando células embriogênicas (citoplasma denso), proembriões (seta) e células parenquimáticas. E: Calose identificada por meio de coração com Azul de Anilina e exposição à luz ultravioleta; notar ausência de calose nas células parenquimáticas laterais. F: Células embriogênicas isoladas e proembriões. G: Amiloplastos conspícuos observados por teste com reagentes *Periodic Acid Schiff* (PAS) e Lugol (quadrado lateral). Abreviações: (p) parênquima e (pe) proembriões. Barras = A: 2 mm; B, D: 200 µm; C, F, G: 50 µm e E: 10 µm.200

Figura 8. Número médio de embriões somáticos observados aos 30 dias em meio suplementado com diferentes concentrações de BAP e 100 µM de Espermidina + 1000 de µM Putrescina, durante a embriogênese somática em gueroba (*Syagrus oleracea*) a partir de segmentos foliares de plantas germinadas *in vitro*. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam o erro padrão.204

Figura 9. Evolução de embriões somáticos primários e secundários de gueroba (*Syagrus oleracea*) a partir de segmento foliar de planta jovem germinada *in vitro* em meio com poliamina. A: Embriões somáticos (pontilhado) sobre calo mucilaginoso inicial aos 30 dias em meio de diferenciação. B-D: Embriões somáticos em crescimento e fusionados aos 60, 90 e 120 dias em meio de diferenciação. E, F: Desenvolvimento de embriões secundários globulares (setas) aos 150 e 240 dias, respectivamente, em meio de diferenciação. Abreviação: (es) embrião somático. Barras: A-F: 2mm205

Figura 10. Aspectos da embriogênese somática induzida a partir de segmentos foliares de plantas germinadas *in vitro* de gueroba (*Syagrus oleracea*) em meio suplementado com poliaminas. A: Formações calogênicas mucilaginosas observadas aos 30 dias em meio de indução. B: Calo embriogênico observado aos 120 dias em meio de indução. C: Calo friável observado aos 150 dias em meio de indução. D: *Cluster* de embriões somáticos em estágio globular observado aos 150 dias em meio de indução. E, F: Embriões somáticos observados em meio de diferenciação. G: Embriões somáticos brancos (setas). H: Embrião somático com alongamento do pecíolo cotiledonar e esverdeamento; notar embriões somáticos fusionados (seta). Barras = A-D, G, H: 2 mm e E, F: 1 mm.....207

Figura 11. Caracterização morfoanatômica e histoquímica de calo primário desenvolvido a partir de folha imatura de planta germinada *in vitro* de gueroba (*Syagrus oleracea*) utilizada como explante inicial na indução da embriogênese somática. A: Calo primário translúcido, com consistência mucilaginosa (macia e hidratada), verificado sobre explante basal (primeiro explante) após 30 dias em meio de indução. B: Secção transversal de explante basal evidenciando reação de células vasculares; notar

mucilagem (seta). C: Células vasculares com características embriogênicas. D: Células vasculares responsivas com amiloplastos corados com reagentes *Periodic Acid Schiff* - PAS (seta) e Lugol (quadrado lateral); observar intensa coloração com PAS da mucilagem intercelular. E: Células vasculares responsivas com corpos proteicos corados com reagente *Xylidine Ponceau* (XP); notar presença de compostos fenólicos (*). F: Matriz mucilaginosa rica em pectina corada de vermelho (setas) com reagente Vermelho de Rutênio. Abreviações: (fv) feixe vascular e (p) parênquima. Barras = A: 2 mm; B: 500 µm e C- F: 50 µm.209

Figura 12. Caracterização morfoanatômica e histoquímica de explante foliar de planta germinada *in vitro* de gueroba (*Syagrus oleracea*), com início de calo mucilaginoso aos 45 dias em meio de indução. A: Explante foliar com indícios de calos. B: Secção longitudinal de explante foliar, evidenciando reatividade de células do feixe vascular (elemento de vaso indicado por seta) e formação de proembriões (quadrado); atentar-se a mucilagem corada de roxo (*) e detalhe de célula embriogênica (quadrado lateral). C: Detalhe da secção mencionada na letra B. D, E: Proembriões com indícios de polarização. F: Células vasculares responsivas com amiloplastos (seta) corados com reagente *Periodic Acid Schiff* (PAS); observar intensa coloração da mucilagem intercelular com PAS. G: Proembrião com grãos de amido corados com reagente PAS. H: Células vasculares responsivas com grãos de amido (seta) corados com reagente Lugol. I: Células vasculares responsivas com corpos proteicos corados com reagente *Xylidine Ponceau* (XP). J: Proembrião com resquício de proteína corado com XP. K: Matriz mucilaginosa rica em pectina corada de vermelho (*) com reagente Vermelho de Rutênio. Abreviações: (et) elemento traqueal, (p) parênquima e (pe) proembrião. Barras = A: 2 mm; B: 200 µm; C, D, E, F, I, H, K: 50 µm e G, J: 20 µm.212

Figura 13. Caracterização morfoanatômica e histoquímica de calo embriogênico desenvolvido a partir de folhas imaturas de planta jovem germinada *in vitro* de gueroba (*Syagrus oleracea*). A: Calo embriogênico verificado após 120 dias em meio de indução. B: Secção anatômica de calo embriogênico. C: Detalhe de zona periférica vacuolada, periférica meristemática e zona interna com características parenquimáticas; observar provável protoderme em formação (pontilhado). D: Embrião somático de origem unicelular surgindo na periferia de calo embriogênico. E, F: Grãos de amido (setas) corados com reagente *Periodic Acid Schiff* (PAS) localizados nas adjacências de células em intensa divisão celular; notar grãos de amido corados com Lugol (quadrado). Abreviações: (ce) calo embriogênico, (es) embrião somático, (sp) supensor, (zm) zona meristemática, (zp) zona parenquimática e (zv) zona vacuolada. Barras = A: 2 mm; B: 500 µm e C-F: 50 µm.214

CAPÍTULO IV

Figura 1. Coleta de palmitos de gueroba [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] em campo. A: Planta jovem doadora do palmito com 4 anos de idade. B: Extremidade inferior da planta mencionada na letra A, com palmito no seu interior. C: Corte da planta doadora do palmito com cerca de 10 anos de idade. D, E: Extremidade superior do estipe da planta mencionada na letra C, com palmito no seu interior.237

Figura 2. Palmito de gueroba [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] utilizado para inoculação *in vitro*. A: Regiões a partir das quais foram excisados os explantes. B: Explantes inoculados em meio de cultura (posição vertical e horizontal).239

Figura 3. Percentual de calos primários em explantes foliares de gueroba (*Syagrus oleracea*) sob influência de diferentes concentrações de Picloram e 2,4-D. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as auxinas em cada concentração e letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as concentrações, dentro de cada auxina, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.246

Figura 4. Aspectos morfológicos da indução de calos de gueroba (*Syagrus oleracea*) a partir de tecidos foliares de uma planta jovem. A: Explante imediatamente antes da inoculação. B: Explante intumescido em início de cultivo. C: Explante exibindo leve oxidação nas bordas seccionadas (setas) após sete dias. D: Explante com formações calogênicas incipientes após 30 dias. E: Explante com calo sobre bordas seccionadas após 120 dias. F: Explante com calo sobre nervura central após 120 dias. G: Explante com calos translúcidos com bordas irregulares após 210 dias. H: Explante com calos nodulares mucilaginosos após 210 dias. I: Calo alongado amarelo compacto após 210 dias. Barras = A, D, E, F, G, H, I: 2 mm e B, C: 5 mm.....248

Figura 5. Aspectos morfológicos de calos oriundos de tecidos foliares de uma planta jovem de gueroba (*Syagrus oleracea*). A: Formação de massa calogênica mucilaginoso. B: Calo embriogênico. C: Calo embriogênico com áreas friáveis (setas). Barras = A, B, C: 2 mm.250

Figura 6. Caracterização morfoanatômica e histoquímica de folhas imaturas oriundas de uma planta jovem de gueroba (*Syagrus oleracea*) utilizadas como explantes iniciais na indução de calos visando à embriogênese somática. A: Aspecto externo de segmentos de folha imatura de gueroba. B: Secção transversal do feixe vascular principal; notar sistema vascular nítido, com tecido esclerenquimático (fibras) ao redor da região vascular. C: Detalhe da nervura principal. D: Detalhe de nervura com menor grau de diferenciação. E: Detalhe da região fibrosa (esclerequimática), hipoderme, epiderme e complexo estomático. F: Secção transversal da lâmina foliar. G: Secção transversal da lâmina foliar corada com *Periodic Acid Schiff* (PAS), evidenciando a presença de polissacarídeos na bainha parenquimática e estômato. Abreviações: (ab) face abaxial, (ad) face adaxial, (bp) bainha parenquimática, (ep) epiderme, (est) estômato, (fi) fibra – células esclerenquimáticas, (fl) floema, (fv) feixe vascular, (hp) hipoderme, (np) nervura de pequeno calibre, (ng) nervura de grande calibre, (p) parênquima, (pp) parênquima paliçádico e (x) xilema. Barras = A: 2 mm; B: 200 µm e C, D, E, F, G: 50 µm.....252

Figura 7. Caracterização morfoanatômica de calos primários formados após 30 dias em meio de indução, a partir de folhas imaturas de uma planta jovem de gueroba (*Syagrus oleracea*) utilizadas como explantes iniciais na indução de calos. A: Calos primários observados nas quinas do explante. B: Secção transversal do feixe vascular principal de uma folha imatura evidenciando intumescimento de células parenquimáticas. C: Proliferação desorganizada de células com características meristemáticas (seta) nas adjacências de elementos vasculares. D: Tecido esclerenquimático e hipodérmico comprimidos por células parenquimáticas perivasculares intumescidas e algumas com compostos fenólicos (seta). E: Colapso da epiderme e liberação de massa calogênica primária. Abreviações: (cp) calo primário, (fi) fibra – células esclerenquimáticas, (fv) feixe vascular, (hp) hipoderme, (p) parênquima e (x) xilema. Barras = A: 2 mm; C, D: 50 µm e B, E: 200 µm.254

Figura 8. Caracterização morfoanatômica e histoquímica de calos alongados compactos formados após 120 dias em meio de indução, a partir do feixe vascular principal de folhas imaturas de uma planta jovem de gueroba (*Syagrus oleracea*) utilizadas como explantes iniciais na indução de calos. A: Calo alongado surgindo a partir do feixe vascular principal do explante (seta). B: Secção transversal do feixe vascular principal evidenciando calos surgindo dos feixes vasculares. C: Detalhe anatômico do calo com características meristemáticas, causando compressão de alguns tecidos perivasculares (seta); notar divisões celulares periclinais (pontilhado). D: Secção transversal do calo corado com *Periodic Acid Schiff* (PAS), evidenciando a presença de polissacarídeos em células em divisão (setas). E: Secção transversal do calo corado com Lugol, evidenciando a presença de amiloplastos (grãos de amido) em células em divisão. Abreviações: (ab) face abaxial, (ad) face adaxial, (cm) células meristemáticas, (p) parênquima e (x) xilema. Barras = A: 2 mm; B: 500 µm e C, D, E: 50 µm.256

Figura 9. Análises anatômica e histoquímica de diferentes linhagens de calos obtidos a partir de tecidos foliares de gueroba (*Syagrus oleracea*) e corados com *Periodic Acid Schiff* (PAS) e Lugol. A: Explante com calos translúcidos com bordas irregulares. B: Secção longitudinal do calo translúcido com bordas irregulares, evidenciando células meristemáticas na região central. C, D: Calo translúcido com bordas irregulares com acúmulo de amido (seta) na região periférica. E: Explante com calos nodulares mucilaginosos. F: Secção longitudinal do calo nodular, evidenciando células meristemáticas na região central. G, H: Calo nodular com acúmulo de amido (seta) na região periférica. I: Calo alongado, amarelo e compacto. J: Secção longitudinal do calo alongado, evidenciando células meristemáticas na região central. K, L: Calo alongado com acúmulo de amido na região periférica. Abreviações: (cm) células meristemáticas, (cp) células parenquimáticas e (cv) células vacuoladas. Barras = A, E, I: 2 mm, B, C, E, F, G, K: 200 µm; D, H, L: 50 µm e J: 500 µm.261

Figura 10. Caracterização anatômica e ultraestrutural de calo translúcido com bordas irregulares. A: Camadas celulares anatomicamente distintas (células meristemáticas, células parenquimáticas e células vacuoladas). B: Análise ultraestrutural de célula da camada parenquimática. C: Célula parenquimática em intensa atividade metabólica evidenciada pelo complexo de organelas, como mitocôndrias, Complexo de Golgi e ribossomos livres (círculo). D: Análise ultraestrutural de célula da camada meristemática em intensa atividade metabólica. Detalhe de corpo multivesicular visualizado na parede celular (quadrado). E: Núcleo de célula meristemática. Abreviações: (cm) células meristemáticas, (cp) células parenquimáticas, (cv) células vacuoladas, (ec) eucromatina, (hc) heterocromatina, (m) mitocôndria, (n) núcleo, (nl) nucléolo, (r) ribossomos, (v) vacúolo e (CG) Complexo de Golgi. Barra: A: 2 mm; B, D: 1 µm e C, E: 0,5 µm.262

Figura 11. Aspectos morfológicos e anatômicos de calo embriogênico obtido a partir de tecidos foliares de gueroba (*Syagrus oleracea*). A: Morfologia externa. B: Secção anatômica de calo embriogênico com células embriogênicas e proembriões na periferia, indicados por setas. C, D, E: Células embriogênicas, proembriões, células em degradação (*) e compostos fenólicos corados de verde (seta). F-H: Calose identificada por meio de coração com Azul de Anilina e exposição à luz ultravioleta. Abreviações: (pe) proembriões. Barras = A: 2 mm; B: 500 µm; C: 200 µm; D-F: 50 µm; G: 20 µm e H: 10 µm.264

Figura 12. Aspectos histoquímicos de calo embriogênico obtido a partir de tecidos foliares de gueroba (*Syagrus oleracea*) submetidos à indução de calos visando à embriogênese somática. A: Mucilagem polissacarídica, fortemente corada com *Periodic Acid Schiff* (PAS) na região periférica do calo (retângulo). B: Proembriões desprovidos de amiloplastos embebidos em mucilagem polissacarídica. C: Células embriogênicas com amiloplastos (seta). D: Calo embriogênico com corpos proteicos (seta) e compostos fenólicos (*) corados com *Xylidine Ponceau* (XP). E: Detalhe dos corpos proteicos (seta) e compostos fenólicos (*). F: Proembrião com corpos proteicos. Barras = A: 500 µm; B, D: 50 µm e C, E, F: 20 µm.267

Figura 13. Formação de primórdios radiculares a partir de calos oriundos de explantes foliares de uma planta jovem de gueroba (*Syagrus oleracea*) cultivados em meio suplementado com ANA e 2-iP. A: Calo alongado com formação de primórdios radiculares na região periférica. B: Secção anatômica de primórdio radicular. C: Região anatômica com características de coifa e columela. D: Região anatômica com características de procâmbio, com elementos de vaso em diferenciação (no quadrado em destaque) e presença de compostos fenólicos corados de verde (seta). E: Amiloplastos localizados na zona semelhante à columela. Abreviações: (pc) procâmbio, (c) coifa e col (columela). Barras = A: 2 mm; B: 200 µm e C, D, E: 50 µm.269

Figura 14. Aspectos morfológicos da indução de calos de gueroba (*Syagrus oleracea*) a partir de tecidos foliares de uma planta adulta. A: Explante em posição horizontal imediatamente antes da inoculação. B: Explante em posição vertical imediatamente antes da inoculação. C: Explante exibindo formações semelhantes a cristais em uma extremidade da nervura central (*) e calos primário na outra extremidade da nervura central (em contato com o meio de cultura) (seta) após 90 dias em meio de indução. D: Explante com calo sem forma definida sobre nervura central após 120 dias em meio de indução. E: Explante com calos alongados de menor diâmetro (seta) sobre tecido foliar após 120 dias em meio de indução. F: Explante com calo alongado (seta) de maior diâmetro, proveniente da nervura central, após 120 dias em meio de indução. Barras = 2 mm.271

Figura 15. Percentual de formação de calos primários em explantes foliares de gueroba (*Syagrus oleracea*) sob influência de formulações salinas do meio Y3 e MS e diferentes regiões do palmito. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os meios de cultura em cada região do palmito e letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as regiões do palmito, dentro de cada meio de cultura, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.273

Figura 16. Caracterização anatômica de folhas imaturas originadas de uma planta adulta de gueroba (*Syagrus oleracea*) utilizada como explantes iniciais na indução de calos visando à embriogênese somática. A: Folha da região distal. B: Nervura central de folha da região distal. C: Nervura secundária (com menor grau de diferenciação) de folha da região distal. D: Folha da região mediana. E: Nervura central de folha da região mediana. F: Nervura secundária (com menor grau de diferenciação) de folha da região mediana. G: Folha de região proximal. H: Nervura central de folha da região proximal. I: Nervura secundária (com menor grau de diferenciação) de folha da região proximal. Abreviações: (ab) face abaxial, (ad) face adaxial, (fi) fibra – células esclerenquimáticas, (fl) floema, (hp) hipoderme, (p) parênquima e (x) xilema. Barras = A, D, G: 200 µm e E, F, H, I: 50 µm.275

Figura 17. Aspectos histoquímicos de regiões distintas do palmito de gueroba (*Syagrus oleracea*). A: Polissacarídeos (seta) na região central de folha da região mediana corada com *Periodic Acid Schiff* (PAS). B: Amiloplastos (grãos de amido - seta) na região central de folha da região mediana corada com Lugol. C: Polissacarídeos (seta) na região central de folha da região proximal corada com PAS. B: Amiloplastos (grãos de amido - seta) na região central de folha da região proximal corada com Lugol. Abreviações: (fv) feixe vascular e (p) parênquima. Barras = A-D: 50 µm.276

CAPÍTULO V

Figura 1. Espatas contendo inflorescências imaturas de gueroba [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] utilizadas como explantes iniciais para embriogênese somática. A: Espata na axila de folha aclorofilada. B: Espatas fechadas e aclorofiladas utilizadas neste experimento, com diferentes comprimentos e graus de maturidade. C: Aspecto da inflorescência imatura inoculada em meio de indução. Barras = A: 2 mm; B: 15 cm e C: 1 mm.301

Figura 2. Obtenção de flores maduras de gueroba [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] para indução de calos visando à embriogênese somática. A: Espata fechada coletada em campo. B: Espata aberta em câmara de fluxo laminar com flores maduras expostas. C: Ráquila contendo as flores estaminadas e pistiladas. D: Tríade formada por uma flor pistilada central e duas flores estaminadas laterais. E: Flor estaminada com anteras expostas. F: Carpelo extraído da flor pistilada. Barras = B: 6 cm; C: 2 cm; D: 5 mm e E, F: 2 mm.304

Figura 3. Estádios morfológicos da indução de calos e diferenciação de embriões somáticos a partir de inflorescências imaturas de gueroba (*Syagrus oleracea*). A: Calo embriogênico nodular amarelo. B: Calo embriogênico sem formato definido e superfície irregular e embriões somáticos globulares. C: *Cluster* de embriões somáticos brancos. D: Embrião somático em estágio semelhante ao torpedão; notar tricomas. Abreviações: (ce) calo embriogênico, (eg) embrião somático globular e (inf) inflorescência. Barras = A: 1 mm; B, D: 2 mm e C: 5 mm.311

Figura 4. Evolução morfológica do calo primário a plantas de gueroba (*Syagrus oleracea*) a partir de inflorescência imatura, em meio com Picloram. A-D: Desenvolvimento de embriões somáticos aos 30, 60, 120 e 150 dias, respectivamente, em meio de indução. E, F: Embriões somáticos aos 210 e 240 dias, respectivamente, em meio de indução; notar esverdeamento, presença de tricomas e fusão. G: Plantas fusionadas. Barras = A: 1 mm e B-G: 2 mm.312

Figura 5. Análise morfoanatômica das diferentes respostas de inflorescências imaturas de gueroba (*Syagrus oleracea*) submetidas ao processo de embriogênese somática. A: Calo embriogênico nodular amarelo. B: Secção anatômica do calo mencionado na letra A; observar zona meristemática e zona parenquimática. C, D: Grãos de amido (seta) na camada adjacente à zona meristemática evidenciados por meio dos reagentes *Periodic Acid Schiff* (PAS) e Lugol, respectivamente. E: Calo embriogênico sem formato definido e superfície irregular e embriões somáticos globulares (setas). F: Secção anatômica de calo embriogênico; atinar para células periféricas em intensa divisão celular (quadrado lateral). G: Transição de calo embriogênico para embrião somático em estágio globular; observar protoderme em formação (seta, quadrado). H: Detalhe da letra F evidenciando grãos de amido (seta) na camada adjacente à zona meristemática.

Abreviações: (ce) calo embriogênico, (inf) inflorescência, (zm) zona meristemática e (zp) zona periférica. Barras = A, E: 2 mm; B, F, G: 200 µM e C, D, H: 50 µM.314

Figura 6. Análise morfoanatômica de embriões somáticos desenvolvidos a partir de calos embriogênicos oriundos de inflorescência imatura de gueroba (*Syagrus oleracea*). A: Embriões somáticos. B: Superfície de embrião somático por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). C: Secção anatômica longitudinal de embriões somáticos; atentar-se à protoderme e procâmbio. D: Detalhe da protoderme e meristema fundamental sem conteúdo citoplasmático denso. E: Detalhe do procâmbio com elementos de vaso diferenciados. F: Secção anatômica do meristema fundamental de embrião zigótico de gueroba; notar presença de conteúdo citoplasmático denso caracterizado por corpos proteicos. G: Corpos proteicos, corados com *Xylidine Ponceau* (XP), presentes em células do meristema fundamental de embrião zigótico de gueroba. H: Ultraestrutura de célula do meristema fundamental de embrião zigótico de gueroba; notar presença de corpos proteicos conspícuos e corpos lipídicos abundantes. I, J: Letra H em maior magnificação. Abreviações: (cp) corpo proteico, (cl) corpo lipídico, (es) embrião somático, (ev) elemento de vaso, (inf) inflorescência, (mf) meristema fundamental, (pc) procâmbio e (pt) protoderme. Barras = A: 2 mm; B, C: 500 µM; D, E: 50 µM; F, G: 20 µM; H: 2 µM e I, J: 0,5 µM.....316

Figura 7. Estádios morfológicos da indução de calos a partir de inflorescências imaturas durante a embriogênese somática de gueroba (*Syagrus oleracea*). A: Inflorescência intumescida após 30 dias em meio com Picloram. B: Calos primários observados sobre ráquila seccionada (seta) e botões florais mais diferenciados (pontagudos e brancos) após 60 dias em meio com Picloram. C: Explante com intumescimento diferenciado após 60 dias em meio com Picloram. D: Explante com oxidação expressiva após 90 dias em meio sem auxina. E: Explante com notável amarelecimento e botões florais desenvolvidos, após 90 dias em meio com 2,4-D. F: Estruturas nodulares observadas após 90 dias em meio com 2,4-D. G, H, I: Calos primários observados em explantes após 90 dias em meio de indução. J: Calo embriogênico, compacto e com superfície irregular observado após 240 dias em meio de indução. K: Calo nodular com características embriogênicas visualizado após 240 dias em meio de indução. L: Calo mucilaginoso observado após 240 dias em meio de indução. Barras = A: 1 mm e B- L: 2 mm.323

Figura 8. Diferenciação de embriões somáticos a partir de inflorescências imaturas durante a embriogênese somática de gueroba (*Syagrus oleracea*). A-C: Embriões somáticos em fase semelhante ao globular. D: *Clusters* de embriões somáticos fusionados. E: Alongamento de embriões somáticos; notar regiões distal e proximal com colorações distintas. Abreviações: (eg) embrião globular, (rd) região distal e (rp) região proximal. Barras = A, B: 1 mm e C-E: 2 mm.....325

Figura 9. Número médio e total de embriões somáticos observados aos 150 dias em meio de diferenciação, durante a embriogênese somática em gueroba (*Syagrus oleracea*), a partir de três diferentes estádios de maturação (estádios I, II e III) de inflorescências imaturas. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam o erro padrão.....326

Figura 10. Evolução morfológica do calo primário a embriões somáticos de gueroba (*Syagrus oleracea*) a partir de inflorescência imatura (estádio I). A, B: Formações

calogênicas incipientes verificadas na base da ráquila aos 60 e 120 dias, respectivamente, em meio de indução com 675 μM de Picloram. C: Início de oxidação e formação de calo nodular compacto (seta) aos 240 dias em meio de indução. D: Desenvolvimento de massa calogênica mucilaginosa sobre todo o explante e de calo nodular compacto que adquiriu coloração amarela aos 60 dias em meio de diferenciação com 10 μM de Picloram. E: Formação de *cluster* de embriões somáticos globulares translúcidos aos 90 dias em meio de diferenciação com 5 μM de Picloram. F: Desenvolvimento de *clusters* de embriões somáticos, inclusive, alguns com início de alongamento, aos 120 dias em meio de diferenciação com 1 μM de Picloram. G, H: Aquisição de coloração branca e alongamento mais evidente de embriões somáticos, aos 180 dias em meio de diferenciação com 0,45 μM de Picloram (notar assincronia do processo). I, J: Embriões somáticos com evidente alongamento do pecíolo cotiledonar; notar fusionamento. K: Detalhe da letra J; notar fusionamento (seta). Abreviações: (ha) haustório e (pc) pecíolo cotiledonar. Barras = A: 1 mm; B, C, D, E, F, H, J, K: 2 mm e G, I: 5 mm. Verificar alternativa prancha caso o embrião germine (imagem da planta).329

Figura 11. Descrição morfoanatômica de inflorescências imaturas de gueroba (*Syagrus oleracea*) não cultivadas *in vitro*. A: Inflorescência pertencente ao estágio I de desenvolvimento. B: Secção anatômica longitudinal da inflorescência mencionada na letra A. C: Detalhe de primórdio floral. D: Detalhe de feixe vascular; notar elementos de vaso. E: Presença de grãos de amido conspícuos entre tecidos vasculares visualizados com reagente Lugol. F: Inflorescência pertencente ao estágio III de desenvolvimento. G: Secção anatômica longitudinal da inflorescência mencionada na letra F; observar idioblato com ráfides (quadrados) e compostos fenólicos (seta). H, I: Presença de grãos de amido conspícuos ao longo de todo o tecido (reagentes *Periodic Acid Schiff* - PAS e Lugol, respectivamente); atentar-se para feixe vascular, idioblastos e compostos fenólicos (corados de marrom dourado – Letra D). Abreviações: (bc) bráctea, (ev) elemento de vaso, (fl) flor, (id) idioblasto, (pc) procâmbio, (pf) primórdio floral, (pt) pétala e (sp) sépala. Barras = A, F: 2 mm; B, G: 500 μm ; C- E: 50 μm e H, I: 200 μm .331

Figura 12. Análise morfoanatômica das diferentes respostas de inflorescências imaturas de gueroba (*Syagrus oleracea*) submetidas ao processo de embriogênese somática. A: Calos primários observados sobre botões florais aos 60 dias em meio de indução. B: Secção anatômica longitudinal de botão floral com início de calo a partir de células externas. C: Magnificação do corte anatômico anterior; notar células em divisão celular. D: Estruturas nodulares embriogênicas observadas aos 90 dias de cultivo em meio de indução. E: Secção anatômica longitudinal de estruturas nodulares embriogênicas; notar zona meristemática periférica com células se dividindo periclinalmente (pontilhado) e camada semelhante à protoderme com células em divisão celular (seta). O reagente *Periodic Acid Schiff* (PAS) revelou grãos de amido na região periférica (seta). F: Calo embriogênico observado aos 240 dias em meio de indução. G: Secção anatômica do calo embriogênico com zona meristemática proeminente; observar grãos de amido (reagentes PAS e Lugol, respectivamente). H: Calo não embriogênico observado aos 240 dias em meio de indução. I, J: Secção anatômica de calo não embriogênico; atentar-se à coloração roxa entre células (*). Barras = F: 5 mm; C: 1 mm; A, H: 2 mm; B, G, I: 500 μm e D, J: 200 μm334

Figura 13. Caracterização morfoanatômica e histoquímica de embriões somáticos provenientes de inflorescências imaturas de gueroba (*Syagrus oleracea*). A: Embriões somáticos globulares observados aos 30 dias em meio de diferenciação. B: Secção anatômica de embrião globular com protoderme definida e calo embriogênico na base. C:

Detalhe de calo embriogênico. D, E: Grãos de amido (setas) corados com reagentes *Periodic Acid Schiff* (PAS) e Lugol, respectivamente. F: Embriões somáticos em estágio mais avançado de desenvolvimento observados aos 30 dias em meio de diferenciação. G: Secção anatômica de embriões somáticos com protoderme, cordões procambiais evidentes e promeristemas em formação; notar elementos de vaso diferenciados e fusional da protoderme. H, I: Grãos de amido (setas) corados com reagentes PAS e Lugol, respectivamente; atentar-se para estômato (Letra H). Abreviações: (ce) calo embriogênico, (est) estômato, (ev) elemento de vaso, (pm) promeristema, (pt) protoderme, (rd) região distal e (rp) região proximal. Barras = A, F: 1 mm; B, G: 200 μ M e D, E, H, I: 50 μ M.336

Figura 14. Caracterização morfoanatômica e histoquímica de embriões somáticos fusionados provenientes de inflorescências imaturas de gueroba (*Syagrus oleracea*) visualizados aos 30 dias em meio de diferenciação. A: Embriões somáticos fusionados. B: Secção anatômica longitudinal inicial de embriões somáticos fusionados; detalhe de elementos de vaso, protoderme e compostos fenólicos (*). C: Secção anatômica longitudinal de embriões somáticos evidenciando fusional de protodermes; observar compostos fenólicos (seta). D: Detalhe da protoderme fusionada (quadrado - letra C). E, F: Grãos de amido (setas) dispersos no meristema fundamental (reagentes *Periodic Acid Schiff* - PAS e Lugol, respectivamente); observar compostos fenólicos (letra F). G: Compostos fenólicos corados com Dicromato de Potássio. Abreviações: (ev) elemento de vaso e (pt) protoderme. Barras= A: 2 mm; B, C: 500 μ M; D: 50 μ M e E-G: 20 μ M.....338

Figura 15. Aspectos morfoanatômicos de embriões de gueroba (*Syagrus oleracea*). A: Embrião zigótico de gueroba com início de alongamento do pecíolo cotiledonar. (B) Embrião somático de gueroba, proveniente de embriogênese somática indireta a partir inflorescência imatura, com haustório, alongamento de pecíolo cotiledonar e raiz. C: Secção anatômica longitudinal da região haustorial de embrião somático com pecíolo cotiledonar alongado (não corresponde ao embrião exposto na letra B); notar protoderme e procâmbio. D: Secção anatômica longitudinal do eixo embrionário em germinação de embrião somático; observar plúmula (primórdios foliares e promeristema caulinar) e eixo hipocótilo-radícula (procâmbio e promeristema radicular). E: Detalhe da secção anatômica anterior evidenciando o promeristema caulinar. F: Detalhe da secção anatômica (letra D) evidenciando o promeristema radicular. Abreviações: (bc) bainha cotiledonar, (ev) elemento de vaso, (ha) haustório, (pc) procâmbio, (pf) primórdio foliar, (pt) protoderme, (pmc) promeristema caulinar, (pmr) promeristema radicular e (ra) raiz. Barras= A: 0,6 mm; B: 2 mm; C, D, F: 500 μ M e E: 50 μ M.340

Figura 16. Percentagem de oxidação, de formação de calos primários e de calos com potencial embriogênico durante a embriogênese somática em gueroba (*Syagrus oleracea*) a partir de três diferentes explantes provenientes de flores femininas maduras. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam o erro padrão.....342

Figura 17. Estádios morfológicos da indução de calos a partir de flores maduras visando à embriogênese somática de gueroba (*Syagrus oleracea*). A: Explante oxidado aos 30 dias de cultivo. B: Formações calogênicas a partir de carpelos repartidos já aos 30 dias de cultivo. C: Calo esponjoso. D: Secção anatômica de calo esponjoso. E: Superfície do calo esponjoso analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). F: Calo mucilaginoso. G: Secção anatômica de calo mucilaginoso; notar

mucilagem com coloração roxa. H: Superfície do calo mucilaginoso analisada por MEV. I: Calo compacto com superfície irregular. J: Seccção anatômica de calo compacto. K: Superfície do calo compacto analisada por MEV. L: Calo embriogênico observado aos 270 dias de cultivo. M: Secção anatômica de calo embriogênico. N: Presença de grãos de amido em células meristemáticas do calo embriogênico. Barras = A, C, F, I: 5 mm; B, L: 2 mm; D, E, G: 200 μ M; J, M: 500 μ M; H, K: 100 μ M e N: 50 μ M.345

Figura 18. Possíveis embriões somáticos provenientes de flores maduras de gueroba (*Syagrus oleracea*), via embriogênese somática indireta. A, B: Possíveis embriões somáticos (setas) em estágio semelhante ao globular em meio com 1 μ M de Picloram. C: Possíveis embriões somáticos com coloração esbranquiçada em meio com 0,045 μ M de Picloram. Abreviação: (es) embrião somático. Barras = A: 2 mm; B: 1 mm e C: 0,5 mm.346

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Diâmetro de núcleos e nucléolos e espessura de paredes celulares de células do embrião zigótico no tempo inicial (tempo 0 dias), células não embriogênicas e embriogênicas (7 dias de cultivo) e células meristemáticas de protuberâncias (14 dias de cultivo).....112

CAPÍTULO III

Tabela 1. Composição dos meios de cultura e períodos de tempo (dias) usados no processo de embriogênese somática em gueroba (*Syagrus oleracea*) a partir de segmentos foliares *in vitro* sob efeito inicial de pré-tratamentos (incubação em luz e escuro).....179

Tabela 2. Composição dos meios de cultura e períodos de tempo (dias) usados no processo de embriogênese somática em gueroba (*Syagrus oleracea*) a partir de segmentos foliares *in vitro* sob efeito inicial de poliaminas.....182

Tabela 3. Panorama dos dados obtidos (valores médios considerando seis repetições/tratamento) durante a embriogênese somática em gueroba (*Syagrus oleracea*) a partir de segmentos foliares oriundos de plantas germinadas *in vitro*.....192

Tabela 4. Percentagens de oxidação e de calos primários observados aos 90 dias e de calos embriogênicos observados aos 210 dias em meio de indução com 450 µM de Picloram e poliaminas em diferentes concentrações, durante a embriogênese somática em gueroba (*Syagrus oleracea*) a partir de segmentos foliares de plantas germinadas *in vitro*.....203

CAPÍTULO IV

Tabela 1. Composição dos meios de cultura e períodos de tempo (dias) usados no processo de embriogênese somática em gueroba (*Syagrus oleracea*) a partir de tecidos foliares de uma planta jovem (4 anos) sob efeito de diferentes auxinas e concentrações na indução de calos (experimento 2.1.1).....240

Tabela 2. Composição dos meios de cultura e períodos de tempo (dias) usados no processo de indução de calos visando à embriogênese somática em gueroba (*Syagrus oleracea*) a partir de tecidos foliares de uma planta adulta (cerca de 10 anos), sob efeito de diferentes meios de cultura, das regiões do palmito e da posição dos explantes na indução de calos (experimento 2.1.2).....241

CAPÍTULO V

- Tabela 1.** Composição dos meios de cultura e períodos de tempo (dias) utilizados no processo de embriogênese somática em gueroba (*Syagrus oleracea*) a partir de inflorescências imaturas sob influência de diferentes auxinas em baixa concentração na fase de indução de calos (Experimento 1).....306
- Tabela 2.** Composição dos meios de cultura e períodos de tempo(dias) utilizados no processo de embriogênese somática em gueroba (*Syagrus oleracea*) a partir de inflorescências imaturas, com diferentes graus de maturidade, sob influência de diferentes auxinas em altas concentrações na fase de indução de calos (Experimento 2).....307
- Tabela 3.** Composição dos meios de cultura e períodos de tempo (dias) utilizados no processo de indução de calos visando à embriogênese somática em gueroba (*Syagrus oleracea*) a partir de diferentes explantes provenientes de flores femininas maduras (Experimento 3)307
- Tabela 4.** Efeito das auxinas Picloram e 2,4-D em diferentes concentrações e de três estádios de desenvolvimento de explantes sobre as percentagens de oxidação e de calos primários, durante a embriogênese somática de gueroba (*Syagrus oleracea*), a partir de inflorescências imaturas.....320

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	Por cento
½	Metade
µm	Micrômetro
µM	Micromolar
AIA	Ácido indolacético
AIB	Ácido indolbutírico
ANA	Ácido naftalenoacético
ANOVA	Análise de variância
AG₃	Ácido giberélico
Atm	Atmosfera
BAP	6-benzilaminopurina
cm	Centímetro
cm²	Centímetro quadrado
°C	Grau Celsius
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2-iP	2-isopentenladenina
et al.	E colaboradores
Fe-EDTA	Ferro - Ácido etilenodiamino tetra-acético
g	Gramas
g.L⁻¹	Gramas por Litro
h	Hora
L	Litro
mg	Miligramas
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
MS	Meio de cultura formulado por Murashige e Skoog (1962)
NaOCl	Hipoclorito de sódio
Picloram	Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico
pH	Potencial hidrogeniônico
PVC	Policloreto de polivinila
TDZ	Thidiazuron
v/v	Volume por volume
Y3	Meio de cultura formulado por Eeuwens (1976)

SUMÁRIO

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE GUEROBA [<i>Syagrus oleracea</i> (Mart.) Becc.] COM ÊNFASE EM ASPECTOS MORFOANATÔMICOS, HISTOQUÍMICOS E ULTRAESTRUTURAIS	1
RESUMO	1
INTRODUÇÃO GERAL	5
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	8
OBJETIVOS.....	11
1.1 Objetivo geral.....	11
1.2 Objetivos específicos	11
CAPÍTULO I	12
REVISÃO DE LITERATURA: <i>Syagrus oleracea</i> (Mart.) Becc. E EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM PALMEIRAS	13
1. <i>Syagrus oleracea</i> (Mart.) Becc.	13
1.1 Aspectos gerais: distribuição geográfica, classificação ecológica, caracterização morfológica e germinação	13
1.2 Importância econômica.....	18
2. Embriogênese somática em palmeiras.....	21
2.1 Conceitos iniciais e indução.....	21
2.2 Fatores indutores da embriogênese somática: reguladores de crescimento e estresses.....	27
2.3 Rotas de desenvolvimento e origens uni e multicelular de embriões somáticos	31
2.4 Fases da embriogênese somática	36
2.5 Fatores que influenciam a embriogênese somática.....	39
2.6 Embrião zigótico x embrião somático	43
2.7 Aplicações da embriogênese somática.....	45
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

CAPÍTULO II.....	12
TRANSIÇÃO DE CÉLULAS SOMÁTICAS PARA EMBRIOGÊNICAS E FORMAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE GUEROBA [<i>Syagrus oleracea</i> (Mart.) Becc.] COM ÊNFASE EM ASPECTOS MORFOANATÔMICOS, HISTOQUÍMICOS E ULTRAESTRUTURAIS	82
RESUMO	83
2.1 Material vegetal	88
2.2 Indução de embriões somáticos	88
2.3 Análises anatômica, histoquímica e ultraestrutural.....	89
3. RESULTADOS	91
3.1 Caracterização anatômica, histoquímica e ultraestrutural	91
3.1.1 Endosperma e embrião zigótico	91
3.1.2 Indução de embriões somáticos	97
7 dias.....	97
14 dias.....	106
21 dias.....	114
30 dias.....	117
60 dias.....	120
90 dias.....	123
120 dias.....	126
4. DISCUSSÃO.....	130
4.1 Caracterização anatômica	130
4.2 Caracterização ultraestrutural – células embriogênicas e meristemáticas	137
4.3 Caracterização histoquímica - mobilização de reservas	140
4.4 Barreira fenólica, calose e pectina	145
5. CONCLUSÕES.....	151
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	152

CAPÍTULO III	170
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE GUEROBA [<i>Syagrus oleracea</i> (Mart.) Becc.] A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES DE PLANTAS <i>IN VITRO</i>	170
RESUMO	171
1. INTRODUÇÃO.....	173
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	175
2.1.1 Obtenção dos explantes.....	175
2.1.2 Indução de calos	176
2.1.3 Diferenciação de embriões somáticos.....	177
2.1.4 Regeneração de plantas	178
2.1.5 Análises estatísticas.....	179
2.2 Experimento 2: Influência de poliaminas na indução de calos, formação de embriões somáticos e regeneração de plantas de gueroba.....	180
2.2.1 Obtenção de explantes e indução de calos	180
2.2.2 Diferenciação de embriões somáticos	181
2.2.3 Regeneração de plantas	181
2.2.4 Análises estatísticas.....	182
2.3 Análises anatômica e histoquímica.....	183
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	184
3.1 Experimento 1: Influência dos pré-tratamentos e reguladores de crescimento na indução de calos, formação de embriões somáticos e regeneração de plantas de gueroba.....	184
3.1.1 Indução de calos	184
3.1.2 Diferenciação de embriões somáticos	189
3.1.3 Regeneração de plantas	191
3.1.4 Análises anatômica e histoquímica	193
3.2 Experimento 2: Influência de poliaminas na indução de calos, formação de embriões somáticos e regeneração de plantas de gueroba.....	201
3.2.1 Indução de calos	201
3.2.2 Diferenciação de embriões somáticos	203
3.2.3 Regeneração de plantas	205
3.2.4 Análises anatômica e histoquímica	207
4. CONCLUSÕES	215
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	216

CAPÍTULO IV	230
FATORES ENVOLVIDOS NA INDUÇÃO DE CALOS PARA A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE GUEROBA [<i>Syagrus oleracea</i> (Mart.) Becc.] A PARTIR DE TECIDOS FOLIARES	230
RESUMO	231
ABSTRACT	232
1. INTRODUÇÃO.....	233
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	236
2.1 Material vegetal e condições de cultivo – indução de calos	236
2.1.1 Influência de diferentes auxinas e concentrações na indução de calos	237
2.1.2 Influência do meio de cultura, das regiões do palmito e da posição dos explantes na indução de calos.....	238
2.2 Multiplicação de calos iniciais.....	239
2.3 Diferenciação de embriões somáticos.....	239
2.4 Análises anatômica e histoquímica.....	241
2.5 Análises estatísticas	242
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	244
3.1 Influência de diferentes auxinas e concentrações	244
3.1.1 Indução de calos	244
3.1.2 Multiplicação de calos iniciais e formação de calos embriogênicos.....	248
3.1.3 Análises anatômica e histoquímicas.....	250
3.2 Influência do meio de cultura, das regiões do palmito e da posição dos explantes	269
3.2.1 Indução de calos	269
3.2.2 Diferenciação de embriões somáticos	273
3.2.3 Análises anatômicas	273
4. CONCLUSÕES	278
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	279

CAPÍTULO V	230
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE GUEROBA [<i>Syagrus oleracea</i> (Mart.) Becc.] A PARTIR DE INFLORESCÊNCIAS	294
RESUMO	295
1. INTRODUÇÃO.....	298
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	300
2.1 Experimento 1: Influência de auxinas em baixa concentração na indução de calos, formação de embriões somáticos e regeneração de plantas	300
2.1.1 Material vegetal e indução de calos	300
2.1.2 Diferenciação e maturação de embriões somáticos.....	301
2.2 Experimento 2: Influência de diferentes auxinas em altas concentrações e de inflorescências com diferentes graus de maturidade na indução de calos, formação de embriões somáticos e regeneração de plantas	302
2.2.1 Material vegetal e indução de calos	302
2.2.2 Diferenciação e maturação de embriões somáticos.....	303
2.3 Experimento 3: Influência de diferentes explantes provenientes de flores femininas maduras na indução de calos	303
2.3.1 Material vegetal.....	303
2.3.2 Indução de calos.....	304
2.3.3 Diferenciação de embriões somáticos	305
2.4 Regeneração de plantas.....	306
2.5 Análises anatômica e histoquímica.....	307
2.6 Análises estatísticas	309
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	310
3.1 Experimento 1: Influência de auxinas em baixa concentração na indução de calos, formação de embriões somáticos e regeneração de plantas	310
3.1.1 Indução de calos.....	310
3.1.2 Diferenciação e maturação de embriões somáticos.....	310
3.1.3 Regeneração de plantas	311
3.1.4 Análises anatômica e histoquímica	313
3.2 Experimento 2: Influência de diferentes auxinas e concentrações e de inflorescências com diferentes graus de maturidade na indução de calos, formação de embriões somáticos e regeneração de plantas	317

3.2.1	Indução de calos	317
3.2.2	Diferenciação e maturação de embriões somáticos.....	324
3.2.3	Regeneração de plantas	327
3.2.4	Análises anatômica e histoquímica	330
3.3	Experimento 3: Influência de diferentes explantes provenientes de flores femininas maduras na indução de calos	341
3.3.1	Indução de calos	341
3.3.2	Diferenciação de embriões somáticos	346
4.	CONCLUSÕES	347
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	348
	CONCLUSÕES GERAIS	356
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	357
	ANEXO	358
	ANEXO 1	359

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE GUEROBA [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] COM ÊNFASE EM ASPECTOS MORFOANATÔMICOS, HISTOQUÍMICOS E ULTRAESTRUTURAIS

RESUMO

A guerocha [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] é uma palmeira oleaginosa nativa do Brasil com grande, porém, subexplorado potencial alimentício. Como outras palmeiras, a guerocha possui apenas crescimento meristemático primário e não forma perfilhos, impedindo que a propagação vegetativa seja feita por métodos convencionais, o que torna a micropropagação, em especial, a embriogênese somática, uma das únicas alternativas para a propagação vegetativa da espécie. Nesse contexto, o trabalho teve como objetivo estabelecer estratégias para a propagação vegetativa de guerocha por embriogênese somática, a partir de diferentes fontes de explantes, bem como elucidar eventos e conceitos subjacentes ao processo, por meio de análises morfoanatômicas, histoquímicas e ultraestruturais. Para tal, inicialmente embriões zigóticos maduros foram utilizados para investigar, por microscopia óptica e eletrônica, as seguintes questões: quais células podem ter estados predeterminados para a embriogênese somática, quais características enquadram as células dentro da categoria pré-embriogênicas determinadas e qual o período de tempo necessário para a reprogramação gênica mínima para a formação de embriões somáticos. Verificou-se que embriões zigóticos, quando em meio de indução com ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), exibem, já aos sete dias de cultivo, alterações anatômicas e ultraestruturais que caracterizam a transição de células somáticas para embriogênicas. Essas células estão localizadas, sobretudo, na protoderme e subprotoderme dos embriões zigóticos, podendo ser consideradas pré-embriogênicamente determinadas para uma redeterminação mínima e, portanto, passíveis de originar embriões somáticos de origem direta e multicelular, os quais são observados já aos 30 dias de cultivo. A eliminação total da auxina 2,4-D do meio de cultivo tardiamente compromete a qualidade dos embriões somáticos obtidos diretamente. Amido e proteína se destacam como fontes de energia necessárias ao processo. Num segundo momento, explantes foliares provenientes de plantas germinadas *in vitro* foram seccionados em segmentos entre 1 e 2 mm de espessura e submetidos a diferentes pré-tratamentos e às auxinas ácido 4-amino-3, 5, 6-tricloropicolínico (Picloram) e 2,4-D (450 μM) para avaliação dos seus efeitos na indução de calos e formação de embriões somáticos. Em seguida, verificou-se o efeito das poliaminas Putrescina e Espermidina, combinadas em diferentes concentrações, na indução de calos, assim como o efeito de 6-benzilaminopurina (BAP) na diferenciação dos embriões somáticos. Neste experimento, Picloram se destacou na produção de embriões somáticos e as poliaminas não foram decisivas na formação de calos primários e embriogênicos, assim como o BAP não favoreceu a diferenciação de embriões somáticos. A origem dos calos, de maneira geral, foi relacionada aos tecidos vasculares e hipotetiza-se a ocorrência de embriões somáticos de ambas origens: uni e multicelular. A regeneração foi lenta, asincrônica e com anormalidades. Nesse trabalho, avaliou-se também o efeito na formação de calos a partir de tecidos foliares de plantas coletadas em campo, de auxinas e diferentes concentrações, tipos de meios de cultura, regiões e posição dos explantes. Para tanto, foram testados os efeitos das auxinas Picloram e 2,4-D, em diferentes concentrações, em explantes provenientes de uma planta jovem de guerocha (4 anos). Já em explantes oriundos de uma planta adulta (cerca

de 10 anos), avaliaram-se os efeitos dos meios de MS e Y3, das regiões distal, mediana e proximal do palmito e das posições horizontal e vertical de tecidos foliares. Conforme as análises, a formulação salina Y3 suplementada com 450 μ M de Picloram é eficiente na produção de calos, a partir de tecidos foliares jovens. Explantes foliares oriundos da região distal do palmito de uma planta adulta de gueroba mostram-se mais competentes para a produção de calos do que os provenientes das demais regiões, devido ao maior grau de diferenciação dos seus tecidos vasculares, de acordo com observações anatômicas. Inflorescências imaturas e flores maduras também foram investigadas como explantes para a embriogênese somática da espécie. Para as inflorescências imaturas, avaliaram-se os efeitos de diferentes auxinas, concentrações e estádios de maturidade dos explantes. Em um primeiro experimento, investigou-se a influência na indução de calos, formação de embriões somáticos e regeneração de plantas das auxinas Picloram e 2,4-D em baixa concentração em meio de MS sem carvão ativado. Em um segundo experimento, avaliaram-se a influência das auxinas supracitadas em quatro diferentes concentrações cada, além da influência dos diferentes graus de maturidade das inflorescências, conforme comprimento das espatas. Já para flores maduras, testou-se a influência na indução de calos de três tipos de explantes (flor pistilada fechada, flor pistilada seccionada longitudinalmente e carpelo seccionado longitudinalmente) inoculados em meio com 450 μ M de Picloram. De modo geral, a auxina Picloram portou-se como mais eficiente que 2,4-D para a indução de calos e formação de embriões somáticos de gueroba a partir de inflorescências imaturas. Tecidos mais imaturos necessariamente não são mais responsivos em termos de desdiferenciação e consequente formação de calos que tecidos menos imaturos. Porém, eles são mais embriogênicos. Análises anatômicas confirmaram a organização bipolar dos embriões somáticos obtidos, além de ausência de conexão vascular com o explante de origem. As análises histológicas sugerem origem multicelular dos embriões e evidenciam similaridades com embriões zigóticos da espécie. Hipotetiza-se que a regeneração foi limitada em função da ocorrência de fusão e da produção deficitária de proteínas de reservas, constatada por análises histoquímicas. Quanto às flores maduras, calos embriogênicos foram observados somente a partir de flores pistiladas seccionadas longitudinalmente. Esses explantes portam-se como fonte alternativa à embriogênese somática de gueroba, apesar do alto grau de diferenciação. Nesse trabalho foi demonstrado que a embriogênese somática pode ser obtida a partir de diferentes fontes de explantes de gueroba, porém com necessidade de otimização das etapas finais do processo, em especial, maturação e germinação de embriões somáticos. Em função dos resultados obtidos, este trabalho apresenta-se como um modelo útil para a investigação dos eventos iniciais da embriogênese somática em palmeiras.

Palavras-chaves: Arecaceae; micropropagação; embriões zigóticos; palmito; inflorescências; auxinas; histologia; Microscopia Eletrônica de Transmissão; ontogênese; embriões somáticos.

SOMATIC EMBRYOGENESIS OF GUEROBA [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] WITH EMPHASIS IN MORPHOANATOMIC, HISTOCHEMICAL AND ULTRASTRUCTURAL ASPECTS

ABSTRACT

The gueroa (*Syagrus oleracea* Mart. Becc.) is an oleaginous palm tree native to Brazil with large, but underexploited food potential. As other palm trees, gueroa has only primary meristematic growth and does not form tillers, preventing vegetative propagation by conventional methods, which makes micropropagation, in particular, somatic embryogenesis, one of the only alternative for the vegetative propagation of the species. In this context, the objective of the work was to establish strategies for the vegetative propagation by somatic embryogenesis using different explants sources, as well as to elucidate events and concepts underlying the process, through morphoanatomical, histochemical and ultrastructural analyzes. To do this, initially mature zygotic embryos were used to investigate, by light and electron microscopy, the following scientific questions: which cells may have predetermined states for somatic embryogenesis, which characteristics frame the cells within the pre-embryogenic fate and what is the period of time required for minimal genetic reprogramming for the formation of somatic embryos. When inoculated in an induction medium with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), zygotic embryos were shown to have anatomical and ultrastructural changes which characterize the transition from somatic to embryogenic cells. These cells are located mainly in the protoderm and subprotoderm of the zygotic embryos, and can be considered pre-embryogenically determined for a minimal redetermination and, therefore, capable of originating somatic embryos of direct and multicellular origin, which are observed already at the 30 days cultivation. The total elimination of 2,4-D from the culture medium compromises the quality of the somatic embryos obtained directly. Starch and protein have stood out as sources of energy needed to process. In a second experiment, leaf explants from in vitro germinated plants were sectioned in segments between 1 and 2 mm thick and submitted to different pre-treatments with 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid (Picloram) and 2,4-D (450 μ M) for evaluation of their effects on callus induction and formation of somatic embryos. Then, the effect of the Putrescine and Spermidine polyamines, combined at different concentrations, on callus induction, as well as the effect of 6-benzylaminopurine (BAP) on the differentiation of somatic embryos were verified. In this experiment, Picloram excelled in the production of somatic embryos and the polyamines were not decisive for primary and embryogenic calli formation, as well as BAP did not favor the differentiation of somatic embryos. The origin of the calli was generally related to the vascular tissues and is hypothesized the occurrence of somatic embryos from both origins: uni and multicellular. Regeneration was slow, asynchronic and with abnormalities. In this work, the callus formation from leaf tissues of plants collected in the field, from auxins and different concentrations, types of culture media, regions and position of the explants was also evaluated. The effects of Picloram and 2,4-D were tested in different concentrations in explants from young plants of gueroa (4 years). In the explants from adult plants (about 10 years), the effects of the MS and Y3 media, the distal, median and proximal regions of the palm heart and the horizontal and vertical positions of leaf tissues were evaluated. According to the analyzes, the Y3 medium supplemented with 450 μ M Picloram is efficient for callus production from young plants leaf tissues. Leaf tissues from the distal palm heart region of adult plants

show to be more competent for callus production than those from other regions. Immature inflorescences and mature flowers have also been investigated as explants for somatic embryogenesis of the species. For immature inflorescences, the effects of different auxins, concentrations and stages of explants maturity were evaluated. In a first experiment, the influence on calli induction, somatic embryo formation and plant regeneration using Picloram and 2,4-D at low concentration in medium without activated charcoal were investigated. In a second experiment, the influence of the above-mentioned auxins was evaluated in four different concentrations, in addition to the influence of the different maturity stages of the inflorescences, according to the length of the spathes. For mature flowers, the influence on calli induction of three types of explants (pistillate flower, longitudinally sectioned pistillate flower and longitudinally sectioned carpel) inoculated in a medium with 450 μ M Picloram was tested. In general, auxin Picloram was more efficient than 2,4-D for callus induction and formation of somatic embryos of *gueroba* from immature inflorescences. More immature tissues are not necessarily more responsive in terms of dedifferentiation and consequent callus formation than less immature tissues, but they are more embryogenic than these. The anatomical analyzes confirmed the bipolar organization of the somatic embryos obtained, besides the absence of vascular connection with the original explant. Histological analyzes suggest the multicellular origin of the embryos and show similarities with zygotic embryos of the species. It is hypothesized that regeneration was limited due to the occurrence of fusion and deficient production of reserve proteins, as evidenced by histochemical analysis. As for mature flowers, embryogenic calli were observed only from longitudinally sectioned pistillate flowers. These explants act as an alternative source to the somatic embryogenesis of *gueroba*, despite the high degree of differentiation. It was verified that the somatic embryogenesis can be obtained from different sources of explants of *gueroba*, but with the need of optimization of the final stages of the process, in particular maturation and germination of somatic. As a function of the results obtained, this work presents as a useful model for the investigation of the initial events of somatic embryogenesis in palm trees.

Keywords: Arecaceae; micropropagation; zygotic embryos; palm heart; inflorescences; auxins; histology; Transmission Electronic Microscopy; ontogenesis; somatic embryos.

INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Syagrus*, quase exclusivo da América do Sul, sobretudo no Brasil (NOBLICK, 2017), pertence à divisão Magnoliophyta (Angiospermae), ordem Arecales (Principes), família Arecaceae (Palmae) (ALVES; DEMATTÊ, 1987) e compreende cerca de 65 espécies (57 dessas ocorrem em território brasileiro), duas subespécies e 14 híbridos naturais (NOBLICK, 2017). O gênero ocupa uma diversidade de habitats (NOBLICK, 2017) e é muito variável em termos morfológicos (HENDERSON; GALEANO; BERNAL, 1995; DRANSFIELD *et al.*, 2008; NOBLICK, 2017) e se destaca como o de maior representatividade na região Central do Brasil, notadamente, em áreas de Cerrado (HENDERSON; GALEANO; BERNAL, 1995). Algumas das suas espécies são muito valorizadas localmente pelos vários produtos que podem fornecer, com destaque para *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc., a única palmeira produtora de palmito amargo entre as exploradas comercialmente no Brasil (NUNES, 2010; PINTO *et al.*, 2010).

Syagrus oleracea, popularmente conhecida como gueroba, é uma palmeira típica do Cerrado, cujo cultivo se projeta como uma excelente opção de diversificação de renda do pequeno e médio produtor rural. Essa espécie fornece uma gama de produtos úteis, como as folhas utilizadas para alimentação animal (ALMEIDA *et al.*, 2000; BRANDÃO; LACA-BUENDIA; MACEDO, 2002) e os frutos e sementes utilizados na culinária local, ou ainda, consumidos *in natura* (DINIZ; SÁ, 1995; AGUIAR; ALMEIDA, 2000). As sementes também podem ser usadas para extração de óleo comestível, óleo para fabricação de cosméticos, bem como, uma alternativa para produção de biodiesel (COIMBRA; JORGE; 2011a, 2012; NOZAKI *et al.*, 2012; DIAS; LAUREANO; MING, 2014). Ressalta-se também o potencial ornamental dessa palmeira (BOVI; BORTOLETTO, 1998; LORENZI, 2002).

Contudo, o seu principal produto comercializável é o palmito de característico sabor amargo, o qual tem lugar de destaque, principalmente, na região central do país (MELO, 2000; LORENZI *et al.*, 2004). Esse palmito diferencia-se significativamente daqueles produzidos pelos gêneros *Euterpe* (Açaizeiro e Juçara) e *Bactris* (Pupunheira) (HIANE *et al.*, 2011), que apresentam textura mais firme e sabor adocicado (MELO, 2000).

A gueroba, embora já seja cultivada e possua potencial econômico conhecido, ela ainda apresenta um déficit expressivo de conhecimento técnico e científico em

diversos pontos da sua cadeia produtiva. A literatura para essa cultura é limitada, existindo vários “gargalos” com referência ao armazenamento de sementes, quebra de dormência, propagação e cultivo em geral (substrato, espaçamentos, recipientes, adubação, controle fitossanitário), populações, lançamento de variedades, uniformidade e qualidade do palmito (tamanho e sabor).

Outro importante aspecto referente à espécie é o avanço indiscriminado do desmatamento na região Centro-Oeste do país, o que pode reduzir drasticamente a sua variabilidade genética (NASCENTE; PEIXOTO; SANTOS, 2000; DIAS, 2012; SOARES, PIMENTA; GUIMARÃES, 2013). Menciona-se também o caráter extrativista da cultura.

Nesse sentido, a exploração comercial sustentável da gueroba depende do desenvolvimento de atividades e tecnologias, que incluem a caracterização da variabilidade genética remanescente, seleção de genótipos superiores (domesticação), além do desenvolvimento de métodos eficientes de propagação, a fim de propiciar condições para o desenvolvimento de trabalhos futuros de melhoramento genético (seleção de variedades adaptadas a diferentes condições ambientais, mais resistentes à pragas e doenças, que produzam maior número de frutos, padronização do tamanho e sabor do palmito, redução do tempo de cultivo) e subsidiar estratégias de conservação de germoplasma. Todavia, a carência de estudos e iniciativas constitui mais um “gargalo” em sua cadeia produtiva.

Vale ressaltar que a propagação da maioria das palmeiras, não diferente para a gueroba, é realizada exclusivamente por via sexuada. Contudo, a baixa germinabilidade, normalmente lenta e desuniforme, associada à alta influência de fatores ambientais e/ou relacionados à própria planta, como a dormência física (MELO, 2000) e a baixa viabilidade de suas sementes, particularmente, em função da destruição do endosperma e embrião ocasionada pelo bicho do coco (coleóptero *Pachymerus nucleorum* Fabr. - Bruchidae) (GARCIA; VIEIRA; COSTA, 1979; GARCIA; ROSA; COSTA, 1980; DINIZ; SÁ, 1995; DIAS, 2012), acabam por dificultar o cultivo da gueroba em escala comercial. Adicionalmente, não é possível propagar assexuadamente a gueroba por técnicas convencionais, uma vez que essa espécie não produz afilhos (LORENZI *et al.*, 2004). Nesse contexto, o emprego de técnicas baseadas na cultura de tecidos *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.

Em palmeiras, dentre as diferentes técnicas de propagação *in vitro*, a propagação por embriogênese somática é considerada a mais promissora e eficiente (REE; GUERRA, 2015). A iniciação da técnica, de modo geral, tem se baseado na exposição de células ou tecidos provenientes de diferentes explantes (embriões zigóticos, inflorescências, ápices caulinares, folhas imaturas) às condições controladas *in vitro* que incluem, além das ambientais, concentrações de sais minerais, compostos orgânicos (DUDITS *et al.*, 1995; FEHÉR; PASTERNAK; DUDITS, 2003; ZAVATTIERI *et al.*, 2010) e, principalmente, reguladores de crescimento, como auxinas e citocininas (JIMÉNEZ, 2005; ELHITI; STASOLLA; WANG, 2013). Sob tais estímulos, células somáticas se tornam determinadas a seguir a rota embriogênica, regenerando embriões somáticos (ELHITI; STASOLLA; WANG, 2013) e, conseqüentemente, plantas. Ressalta-se que, até o momento, não existem relatos na literatura sobre trabalhos de embriogênese somática direcionados à *Syagrus oleracea* nem a outras espécies do gênero *Syagrus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, J. L. P.; ALMEIDA, S. P. **A Gueroba (*Syagrus oleracea* Becc.) nas Comunidades Rurais II: sistema de produção e avaliação econômica.** Planaltina: Embrapa Cerrados, 2000. 47p.
- ALMEIDA, S. P.; BONNAS, D. S.; JORDÃO, P. R.; AGUIAR, J. L. P. **A Gueroba (*Syagrus oleracea* Becc.) nas Comunidades Rurais I: aproveitamento agroindustrial.** Planaltina: Embrapa Cerrados, 2000. 37p.
- ALVES, M. R. P.; DEMATTÊ, M. E. S. P. **Palmeiras:** características botânicas e evolução. Campinas: Fundação Cargill, 1987. 129p.
- BOVI, M. L. A.; BORTOLETTO, N. Palmito-gariroba: *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc. In: FAHL, J. I.; CAMARGO, M. B. P. de; PIZZINATTO, M. A.; BETTI, J. A.; MELO, A. M. T. de; De MARIA, I. C.; FURLANI, A. M. C. (Ed.). **Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas.** Campinas: IAC, 1998. p. 258-259.
- BRANDÃO, M.; LACA-BUENDIA, J. P.; MACEDO, J. F. *Syagrus oleracea* (Mart) Becc. In: BRANDÃO, M.; LACABUENDIA, J. P.; MACEDO, J. F. **Árvores nativas e exóticas do Estado de Minas Gerais.** Belo Horizonte: EPAMIG, 2002. p. 63.
- COIMBRA, M. C.; JORGE, N. Characterization of the Pulp and Kernel Oils from *Syagrus oleracea*, *Syagrus romanzoffiana*, and *Acrocomia aculeata*. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 8, p. 1156-1161, 2011a.
- COIMBRA, M. C.; JORGE, N. Proximate composition of guariroba (*Syagrus oleracea*), jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) and macaúba (*Acrocomia aculeata*) palm fruits. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2139-2142, 2011b.
- DIAS, J. E. **Cadeia produtiva do óleo de gueroba (*Syagrus oleracea* Becc.): geração de renda para agricultores familiares e promoção da agrobiodiversidade, Buriti de Goiás (GO).** 2012. 136p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2012.
- DIAS, J. E.; LAUREANO, L. C.; MING, L. C. Cadeia produtiva do óleo de amêndoas de gueroba (*Syagrus oleracea*): geração de renda para agricultores familiares e promoção da agrobiodiversidade. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 9, n. 1, p. 122-133, 2014.
- DINIZ, J. A.; SÁ, L. F. **A cultura da guariroba.** Goiânia: EMATER-GO, 1995. 16 p. (Boletim Técnico, 3).
- DRANSFIELD, J.; UHL, N. W.; ASMUSSEN, C. B.; BAKER, W. J.; HARLEY, M. M.; LEWIS, C. E. **Genera Palmarum:** the evolution and classification of palms. Royal Botanical Garden, Londres: Kew Publishing. 732 p. 2008.
- DUDITS, D.; GYÖRGYÉY, J.; BÖGRE, L.; BAKO, L. **Molecular biology of somatic embryogenesis.** In: THORPE, T. A. (Ed.). *In vitro* Embryogenesis in Plants. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 267-308.

- ELHITI, M.; STASOLLA, C.; WANG, A. Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 49, p. 631-642, 2013.
- FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, p. 201-228, 2003.
- GARCIA, A. H.; VIEIRA, J. R.; COSTA, M. G. G. Contribuição ao conhecimento da biologia do *Pachymerus nucleorum* Fabr., 1792 (Bruchidae-Coleoptera) em *Syagrus oleracea* Mart. (Palmae). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 9, n.1, 1979.
- GARCIA; ROSA, J. A. M.; COSTA, M. G. G. Contribuição ao conhecimento do ataque do *Pachymerus nucleorum* Fabr., 1792 (Bruchidae-Coleoptera) em *Syagrus oleracea* Mart. (Palmae). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 10, n. 1, 1980.
- HENDERSON, A.; GALEANO, G.; BERNAL, R. **Field Guide to the Palms of the Americas**. New Jersey: Princeton University, 1995. 352 p.
- HIANE, P. A.; SILVA, V. C. F.; RAMOS FILHO, M. M.; RAMOS, M. I. L.; CAMPOS, R. P. Caracterização química do palmito guariroba *in natura* e congelado. **Ciência Rural**, v. 41, n. 6, p.1082-1087, 2011.
- JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, v. 47, p. 91-110, 2005.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 368 p.
- LORENZI, H.; SOUZA, H.M.; COSTA, J.T.M.; CERQUEIRA, L.S.C.; FERREIRA, E. **Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Plantarum, 2004. 432 p.
- MELO, B. de. **Cultivo de embrião *in vitro* da Guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.)]**. 2000. 117p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.
- NASCENTE, A. S.; PEIXOTO, N.; SANTOS, C. W. F. Peso de sementes e emergência de plântulas de guariroba (*Syagrus oleracea* Becc.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 30, n. 2, p.77-79, 2000.
- NOBLICK, L. R. A revision of the genus *Syagrus* (Arecaceae). **Phytotaxa**, v. 294, n. 1, p. 1-262, 2017.
- NOZAKI, V. T.; MUNHOZ, C. L.; GUIMARÃES, R. C. A; HIANE, P. A.; ANDREU, M. P.; VIANA, L. H.; MACEDO, M. L. R. Perfil lipídico da polpa e amêndoa da guarirova. **Ciência Rural**, v. 42, n. 8, p. 1518-1523, 2012.
- NUNES, H. F. **Estudo fenológico e morfológico da palmeira guariroba (*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.)**. 2010. 69p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Goiás, Campus Jataí, Jataí, 2010.

PINTO, J. F. N.; REIS, E. F.; FALEIRO, F. G.; BARBOSA, E. C. C.; NUNES, H. F.; PINTO, J. F. N. Seleção de descritores vegetativos para caracterização de acessos de guariroba (*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, p. 832-839, 2010.

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

SOARES, K. P.; PIMENTA, R. S.; GUIMARÃES, C. A. Duas novas espécies de *Syagrus* Mart. (ARECACEAE) para o Brasil. **Ciência Florestal**, v. 23, n. 3, p. 417-426, 2013.

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, 1-9, 2010.

OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

- Estabelecer estratégias para a reprodução vegetativa de gueroba [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] por embriogênese somática, bem como elucidar eventos e conceitos subjacentes ao processo.

1.2 Objetivos específicos

- Avaliar diferentes fontes de explantes (embriões zigóticos, tecidos foliares e inflorescências) durante a indução de calos, formação de embriões somáticos e regeneração de plantas de gueroba.
- Investigar a influência de auxinas, citocininas e poliaminas em variadas concentrações nas distintas fases da embriogênese somática.
- Definir o meio basal, a região do tecido foliar e a posição do explante foliar mais responsivas à produção de calos visando à embriogênese somática de gueroba.
- Avaliar a influência do grau de maturidade de explantes reprodutivos (inflorescências) sobre as fases da embriogênese somática de gueroba
- Compreender e elucidar conceitos subjacentes à embriogênese somática por meio de avaliações e descrições sobre as alterações morfoanatômicas, histoquímicas e ultraestruturais de calos e embriões somáticos formados a partir de diferentes fontes de explantes de gueroba, sobretudo, daqueles formados a partir de embriões zigóticos.

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA: *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc. E EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM PALMEIRAS

REVISÃO DE LITERATURA: *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc. E EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM PALMEIRAS

1. *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.

1.1 Aspectos gerais: distribuição geográfica, classificação ecológica, caracterização morfológica e germinação

Syagrus oleracea (Mart.) Becc., espécie monocotiledônea pertencente à família Arecaceae, subfamília Arecoideae, tribo Cocoseae, subtribo Attaleinae e gênero *Syagrus* (DRANSFIELD *et al.*, 2008), é uma palmeira nativa do Brasil, que apresenta como centros de distribuição geográfica as Regiões Leste (Ceará, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná) e Central do país (Tocantins, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul) (Figura 1) (HENDERSON; GALEANO; BERNAL, 1995; NASCENTE; PEIXOTO; SANTOS, 2000; LORENZI *et al.*, 2010).



Figura 1. Distribuição geográfica de *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc. no território brasileiro. Fontes: Henderson, Galeano, Bernal (1995), Nascente, Peixoto e Santos (2000) e Lorenzi *et al.* (2010).

Em função dessa vasta distribuição, essa palmeira possui várias sinonímias regionais, tais como: guariroba, gariroba, gueiroba, gueroba, guarirova, gueirova, coqueiro-amargoso, catolé, pati-amargoso, palmito-amargoso, coco-católé, coco-amargoso, coco babão, jaguaroba (HENDERSON; GALEANO; BERNAL, 1995; LORENZI *et al.*, 2010) e guahiro (NOBLICK, 2017).

A gueroba ecologicamente se insere na categoria sucessional secundária tardia (FONSECA; RODRIGUES, 2000), caracterizada pela ocorrência em locais com condições de sombreamento médio ou luminosidade não muito aguda, como clareiras pequenas, bordas de clareiras grandes, bordas de floresta ou sub-bosque não densamente sombreado (GANDOLFI; LEITÃO FILHO; BEZERRA, 1995). De acordo com Noblick (2017), essa palmeira é típica de florestas semidecíduas e Cerrado.

A espécie apresenta raiz do tipo fasciculada e cilíndrica (LORENZI *et al.*, 2004). Possui estipe colunar ou cilíndrico simples (sem perfilho), resistente (MELO, 2000), anelado, com altura variando em torno de 5 a 20 m e diâmetro de 15 a 30 cm (LORENZI *et al.*, 2010) (Figura 2A). As folhas juvenis são simples e lanceoladas, com nervação paralela, compostas por nervuras largas, dispostas longitudinalmente (BATISTA *et al.*, 2011a). As folhas adultas, dispostas em forma de espiral e moderadamente arqueadas, apresentam coloração verde-escura, em número de 12 a 21 contemporâneas, com bainha fibrosa e folíolos em cada lado da raque, lineares, de ápice comumente acuminado e assimétrico (Figura 2B) (LORENZI *et al.*, 1996; LORENZI *et al.*, 2010).

A atividade reprodutiva é constante (NUNES, 2010; DIAS, 2012; NOBLICK, 2017), com frutificação mais abundante entre os meses de agosto e fevereiro (BOVI; BORTOLETTO, 1998). As inflorescências interfoliare, de coloração creme-esbranquiçada, compostas por flores unissexuais (ALMEIDA *et al.*, 2000), são envolvidas por uma bráctea peduncular lignificada, profundamente sulcada, com comprimento total variando entre 0,84 e 1,28 m e largura em torno de 0,12 e 0,22 m (LORENZI *et al.*, 2004) (Figura 2C e D). Geralmente, na região basal das ráquias, as flores são dispostas em tríade formada por uma flor pistilada central e duas flores estaminadas laterais (DRANSFIELD *et al.*, 2008), enquanto na região apical das ráquias observa-se somente flores estaminadas.

Os cachos apresentam comprimento entre 20 e 40 cm (DINIZ; SÁ, 1995; BOVI; BORTOLETTO, 1998; BRANDÃO; LACA-BUENDIA; MACEDO, 2002), com produção aproximada de 4 a 8 cachos por safra (DIAS; LAUREANO; MING, 2014). Os

frutos são do tipo drupa elipsoides, com comprimento de cerca de 4,0 a 5,5 cm (LORENZI *et al.*, 2010) (Figura 2D).

Os frutos se portam como climatérios (SANTELLI; CALBO; CALBO, 2006), com epicarpo liso e coloração variante em função do grau de maturação (verde, verde-amarelado, amarelo e pardo) (SANTELLI; CALBO; CALBO 2006; DIAS, 2012); mesocarpo amarelado (quando maduro), fibro-carnoso, espesso, adocicado e comestível, e endocarpo marrom, ovóide, espesso, lignificado, impermeável, com três poros germinativos sendo somente um funcional (responsável por trocas gasosas, embebição e saída de estruturas da plântula). Envolvida pelo endocarpo, encontra-se a semente (coco, coquinho ou amêndoa) albuminosa, ovóide, adocicada, comestível, macia, oleaginosa e coberta por tegumento amarronzado (ALMEIDA *et al.*, 2000; MELO, 2000; NASCENTE; PEIXOTO; SANTOS, 2000; LORENZI *et al.*, 2004; NOBLICK, 2017). Em uma cavidade interna da semente se localiza o embrião que é lateral, periférico, reto, com aproximadamente 2,76 mm de comprimento (BATISTA *et al.*, 2011a).

A propagação da gueroba ocorre pela via seminífera, apresentando germinação lenta, irregular e com percentuais variantes encontrados na literatura. Diniz e Sá (1995), por exemplo, verificaram um período de 60 a 120 dias para a germinação das sementes de gueroba, com taxa variando entre 50% e 60%. Nascente, Peixoto e Santos (2000), que informam poder germinativo médio de sementes de gueroba de 33%, verificaram germinação até os 150 dias de semeadura. Já Batista *et al.* (2011b) verificaram o início da germinação das sementes de *S. oleracea* entre 37 e 82 dias após a semeadura, com taxa máxima de germinação de 65%.

Contudo, embriões isolados e cultivados *in vitro* apresentam, segundo Melo *et al.* (2001), germinabilidade rápida e elevada (taxa de germinação de até 93% e tempo de germinação de até 30 dias), possivelmente, em função da eliminação do mecanismo de dormência ocasionado no fruto-semente. De maneira semelhante, Neto *et al.* (2015) obtiveram um percentual médio de 71,1% de germinação de embriões de gueroba *in vitro*. Esses últimos autores ressaltam que essa variabilidade de resultados encontrados para a mesma espécie está relacionada ao processo de secagem e aos consequentes, teor de umidade e vigor das sementes utilizadas.

Para melhor desempenho da germinação dessa espécie, alguns autores recomendam a aplicação de diferentes tratamentos que promovam a superação da dormência física consequente do endocarpo lignificado, duro e espesso que envolve as sementes. Tal barreira física dificulta a embebição de água, restringe a difusão de

oxigênio e/ou impõe resistência mecânica a subsequente emergência de estruturas da plântula (DINIZ; SÁ, 1995; MELO, 2000; PINTO *et al.*, 2012).

A germinação de gueroba, similar ao relatado para as palmeiras do gênero *Phoenix* (HENDERSON, 2006) e *Caryota* (ZOYSA, 2000), é classificada como do tipo remota tubular, caracterizada pelo alongamento marcante do pecíolo cotiledonar e ausência da 'lígula' (BATISTA *et al.*, 2011a).



Figura 2. Aspectos gerais da palmeira *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc. A: Indivíduo adulto no campo exibindo estipe cilíndrico simples e folhas adultas dispostas em forma de espiral e moderadamente arqueadas. B: Plantio de gueroba para coleta de frutos. C: Indivíduo com bráctea fechada contendo inflorescência imatura no seu interior. D: Indivíduo com inflorescência interfoliar pós abertura (envolvida por bráctea) e frutos verdes.

1.2 Importância econômica

O cultivo da gueroba configura-se como uma alternativa promissora para a melhoria da renda de pequenos e médios produtores, dada a sua multiplicidade de usos, entre os quais citam-se: i) uso ornamental: desde longa data, o seu bom potencial paisagístico tem sido explorado, sobretudo, em jardins residenciais, praças e calçadas da região Centro-Oeste (DINIZ; SÁ, 1995; BOVI; BORTOLETTO, 1998; LORENZI, 2002; NOBLICK, 2017), ii) uso forrageiro: suas folhas (folíolos) apresentam teores nutricionais complementares a dieta animal (OLIVEIRA *et al.*, 2015), principalmente em épocas de baixa disponibilidade hídrica (ALMEIDA *et al.*, 2000; DIAS; LAUREANO; MING, 2014) e iii) uso medicinal: os potenciais antimicrobiano e gastroprotetivo dos frutos de gueroba têm sido relatados por Silveira *et al.* (2005) e Silva e Parente (2010).

Além dos usos citados anteriormente, a gueroba possui notável potencial alimentar e olerífero; as flores são melíferas (DINIZ; SÁ, 1995); a polpa do fruto, carnosa e adocicada, é normalmente consumida *in natura* e/ou apreciada na culinária local, assim como as sementes e o palmito de sabor amargo característico (Figura 3A) (DINIZ; SÁ, 1995; AGUIAR; ALMEIDA, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2000; BORA; MOREIRA, 2003; LORENZI *et al.*, 2010; COIMBRA; JORGE; 2011b; HIANE *et al.*, 2011; DIAS; LAUREANO; MING, 2014). Ademais, as sementes e mesocarpo possuem potencial para produção de óleo comestível, cosmético (Figura 3B), terapêutico e biodiesel (BORA; MOREIRA, 2003; COIMBRA; JORGE; 2011a, 2012; NOZAKI *et al.*, 2012; DIAS; LAUREANO; MING, 2014). Ressalta-se ainda que os frutos e sementes também são consumidos por uma grande variedade de animais silvestres (MORAES; SOUTO; SCHIEL, 2014; SANTOS; RAGUSA-NETTO, 2014; DIAS; LAUREANO; MING, 2014).

Dentre as possibilidades de exploração comercial de *S. oleracea*, a exploração do palmito de sabor amargo típico tem se destacado (Figura 3A, C-E). Bovi (1998) define palmito como o produto comestível, de formato cilíndrico, macio e tenro, extraído da extremidade superior do estipe de certas palmeiras. É constituído pelo meristema apical e um número variável de folhas internas, ainda não plenamente desenvolvidas e imbricadas, sendo envolto e protegido pela bainha das folhas adultas, mais externas. Em termos industrializáveis, o palmito é constituído de três partes: caulinar (basal), de maior diâmetro, situada na região mais baixa do talo do palmito;

apical, de aspecto foliar e diâmetro reduzido, situada no ápice do talo, e creme, localizada entre as partes basal e apical e de maior valor comercial (RAUPP; CHAIMSOHN, 2001).

O palmito da gueroba é caracterizado principalmente pelo seu sabor adstringente e amargo, provavelmente, devido à ação de compostos fenólicos (UZELAC *et al.*, 1976; CARNEIRO; ROLIM; FERNANDES, 2003) e da presença de altos teores de vitamina “C”, inclusive, superiores aos encontrados no gênero *Euterpe* (Açaí e Juçara) (SHIMOKOMAKI *et al.*, 1975). A maior parte do palmito de gueroba é do tipo caulinar (estipe macio) e a porção aproveitável pesa em torno de 1 a 3 kg (BOVI; BORTOLETTO, 1998; MELO, 2003), apresentando uma textura menos firme que os palmitos do gênero *Euterpe* (Açaí e Juçara) e *Bactris* (Pupunha) (MELO, 2000).

De acordo com Torres, Soares e Maia (2004), o palmito de *S. oleracea* apresentou grande efeito na indução da atividade da Glutathione S-Transferase, que está associada como fator de prevenção ao câncer. O palmito de gueroba congelado, além de ser considerado fonte de compostos fenólicos e vitamina C, também é fonte de fibras e de ferro, e não apresenta quantidade significativa de calorias (HIANE *et al.*, 2011).

O palmito dessa espécie, conforme Aguiar e Almeida (2000), é comercializado geralmente *in natura* e sua industrialização ainda é incipiente. Pode-se mencionar como principais entraves à expansão da sua cadeia produtiva, a variabilidade do tempo de colheita (NASCENTE, 2003), que pode variar, segundo Nascente, Peixoto e Santos (2000) em torno de 2,5 a 6 anos; a ausência de um sistema prático para a estimativa confiável do rendimento do palmito, ou seja, uma associação entre os parâmetros fenotípicos da palmeira cultivada e o seu rendimento industrial em palmito (ALMEIDA *et al.*, 2000), e a mutabilidade no sabor amargo do palmito (DIAS, 2012). Esses fatores, grande parte consequentes do caráter extrativista de exploração, acabam por dificultar a padronização do palmito, diminuindo sua atratividade em relação aos demais para a indústria de conservas (PINTO *et al.*, 2010). Nesse sentido, frisa-se a importância de desenvolvimento de estudos que visem à domesticação e o cultivo comercial dessa espécie.



Figura 3. Exploração econômica da palmeira *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc. A: Área de plantio para extração de palmito com plantas com diferentes idades. B: Produtos cosméticos derivados de frutos de gueroaba. C, D: Palmito não processado comercializado em feiras locais do interior do estado do Goiás – Brasil. E: Comercialização do palmito processado em supermercado.

Não obstante os entraves mencionados, Aguiar e Almeida (2000) consideram a gueroba um sistema lucrativo, com retorno de capital investido, mercado regional e com tendência de crescimento, especialmente, se sua industrialização for implementada. Segundo Nascente e Peixoto (2000), a gueroba tem ganhado espaço na agricultura, principalmente no Estado do Goiás, com destaque para os municípios de Itapuranga, Aurilândia, Goiás, São Luiz de Montes Belos e Piracanjuba (NASCENTE; PEIXOTO; SANTOS, 2000). Aguiar, Almeida e Pereira (1996) ainda ressaltam que a exploração da gueroba apresenta elevada relação de custo/benefício (na aplicação de cada R\$ 1,00 se obtém em média um retorno de R\$ 8,33), configurando-se, portanto, como um agronegócio interessante e promissor, com público consumidor garantido.

Salienta-se também a possibilidade de uso da gueroba em sistemas agroflorestais (MELO, 2003) e consorciada com culturas anuais, como milho e feijão (AGUIAR; ALMEIDA, 2000), ampliando, dessa forma, o horizonte de exploração para os pequenos e médios produtores rurais.

2. Embriogênese somática em palmeiras

2.1 Conceitos iniciais e indução

A família Arecaceae, genericamente conhecida como a família das palmeiras, constitui um dos principais troncos da evolução das monocotiledôneas, sendo composta por 252 gêneros e cerca de 2.600 espécies que se encontram distribuídas mundialmente (DRANSFIELD *et al.*, 2008). Representantes da terceira família botânica mais importante para o ser humano, as palmeiras se destacam em produtividade e multiplicidade de usos (JOHNSON, 1998).

A exploração comercial dos seus inúmeros produtos exige o desenvolvimento de tecnologias, que incluam a seleção de genótipos superiores e sua propagação (MOURA *et al.*, 2009) por sistemas eficientes. Entretanto, a propagação de muitas palmeiras pela via sexuada pode ser ineficiente devido aos baixos percentuais de germinação e reduzida viabilidade de sementes (REE; GUERRA, 2015), acrescentada à heterogeneidade genética resultante, que se configura como fator desfavorável à produção em escala comercial (SALDANHA; MARTINS-CORDER, 2012).

Além do mais, as palmeiras apresentam hábitos singulares de crescimento, com crescimento primário exclusivo (TOMLINSON; HUGGETT, 2012) e produção de

afilhos limitada a poucas espécies (NASCIMENTO; OLIVEIRA, 2011), o que limitam a aplicação de métodos tradicionais de propagação vegetativa e o consequente uso dos genótipos superiores (MOURA *et al.*, 2009; SALDANHA; MARTINS-CORDER, 2012). Nessa conjuntura, as técnicas de cultivo *in vitro*, em especial, a embriogênese somática, se projetam como alternativas promissoras para a propagação clonal de palmeiras (SALDANHA; MARTINS-CORDER, 2012).

A embriogênese somática, relatada pela primeira vez em cenoura (*Daucus carota* L.) (REINERT, 1958; STEWARD *et al.*, 1958) e descrita pela primeira vez em palmeiras por Staritsky (1970) para a espécie *Elaeis guineensis* (dendezeiro), é a técnica da cultura de tecidos mais utilizada na propagação vegetativa de palmeiras (STEINMACHER; CLEMENT; GUERRA, 2007). Segundo Gabr e Tisserat (1985), a clonagem em massa de palmeiras só é possível graças à técnica de embriogênese somática. Desde sua primeira descrição em palmeiras, há relatos do desenvolvimento de protocolos de embriogênese somática para 18 espécies e dezenas de variedades (REE; GUERRA, 2015) (Figura 4). Recentemente, mais uma espécie foi acrescentada a esse grupo, a *Attalea speciosa* (SALEH, 2016).

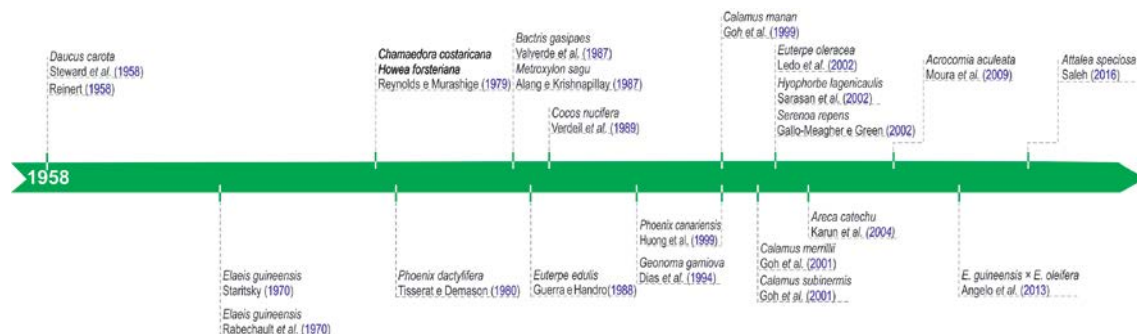


Figura 4. Espécies de palmeiras com protocolos de embriogênese somática publicados. Adaptado de Ree e Guerra (2015).

De fato, a embriogênese somática tem sido descrita, de modo geral, como um processo multietapas que envolve a transição de células somáticas para estruturas similares a embriões zigóticos (EMONS, 1994), sem que ocorra fusão de gametas (WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986). Essas estruturas são bipolares e sem conexão vascular com o tecido de origem (SCHUMANN *et al.*, 1995; VON ARNOLD *et al.*, 2002).

O processo embriogênico a partir de células somáticas é um exemplo da alta plasticidade que as células vegetais exibem (FEHÉR, 2015), consequência da totipotência celular, proposta pela primeira vez em 1902 pelo botânico Gottlieb Haberlandt para descrever a potencialidade intrínseca de uma célula vegetal para originar uma planta completa (HABERLANDT, 1902) e demonstrada experimentalmente somente em 1957 por Harry Waris em *Oenanthe aquatic* (KRIKORIAN; SIMOLA, 1999), e posteriormente, em 1958, mediante a clonagem de uma planta de *Daucus carota* (cenoura) a partir de embrião obtido de células somáticas cultivadas *in vitro* (STEWART *et al.*, 1958).

Gutiérrez-Mora *et al.* (2012) caracterizam a totipotência celular como a habilidade que uma célula vegetal tem de produzir uma planta completa e normal, através de uma série complexa de passos metabólicos e morfológicos coordenados, sem a participação dos processos sexuais. Já Seydoux e Braun (2006) sintetizam o conceito de totipotência como a capacidade de uma única célula de se dividir e produzir todas as células diferenciadas num organismo, incluindo tecidos extraembrionários. Teoricamente, essa habilidade só é factível porque as células vegetais contêm em seus núcleos toda a informação genética necessária à formação de um organismo inteiro (VON ARNOLD *et al.*, 2002; TALAPATRA *et al.*, 2016).

Deve-se ressaltar, contudo, que as células vegetais, com exceção do zigoto e células imediatamente derivadas (ALTAMURA *et al.*, 2016), não são consideradas totipotentes por si só e, para a reaquisição dessa habilidade, tem-se verificado a necessidade de exposição das células a condições adequadas (SMITH; KRIKORIAN, 1989; GUZZO *et al.*, 1994; FEHÉR; BERNULA; GÉMES, 2016; LOYOLA-VARGAS; OCHOA-ALEJO, 2016).

Quiroz-Figueroa *et al.* (2006) salientam, por outro lado, que nem todas as células vegetais em condições específicas expressam essa habilidade, observação sustentada pelo número relativamente baixo de embriões somáticos formados comparado ao número total de células em agregados celulares provenientes de sistemas embriogênicos. Conforme Guzzo *et al.* (1994), a justificativa mais plausível para o fato de que somente algumas células somáticas conseguem fazer essa transição, estaria associada à existência de diferentes receptores para as várias classes de reguladores de crescimento utilizados durante o processo; de tal forma que, a presença de receptores apropriados levaria à embriogênese somática, enquanto que a ausência, conduziria à organogênese ou proliferação desorganizada. Em agregados celulares especificamente,

segundo Yeung (1995), a formação de poucos embriões somáticos está relacionada ao grau de comunicação intercelular (sistema simplástico), ao grau de competição e/ou à cooperação metabólica entre as células.

A transição de células somáticas para embriogênicas compreende dois estádios: indução embriogênica, formado pelas etapas de desdiferenciação, expressão da totipotência e determinação, e o estágio de desenvolvimento, caracterizado pela expressão do programa embriogênico e o conseqüente desenvolvimento completo do embrião – formação dos eixos apical-basal e radial (MAHDAVI-DARVARI; NOOR; ISMANIZAN, 2014; ELHITI; STASOLLA, 2016). De acordo com Jiménez (2001) essas fases aparentam ser independentes uma da outra e controladas por diferentes fatores. Nesses estádios, genes ativos em células somáticas são suprimidos, ao passo que, genes necessários para a embriogênese são ativados (MAHDAVI-DARVARI; NOOR; ISMANIZAN, 2014).

O estágio de indução embriogênica envolve, em resposta a diferentes fatores indutores (reguladores de crescimento e estresses diversos) (KARAMI; SAID, 2010; ZAVATTIERI *et al.*, 2010; GRAFI *et al.*, 2011; FEHÉR, 2015; WICKRAMASURIYA; DUNWELL, 2015), a desdiferenciação de células somáticas, seguida ou em paralelo à reaquisição da totipotência celular (FEHÉR, 2015; ELHITI; STASOLLA, 2016) (Figura 5). A desdiferenciação é o passo em que células especializadas retornam a um estado menos especializado (IWASE *et al.*, 2011; FEHÉR, 2015; JIANG *et al.*, 2015; SUGIYAMA, 2015); ou ainda, conforme Grafi *et al.* (2011), retornam a um estado transitório de células (estado *stem cell-like*), as quais podem seguir, dependendo do estímulo aplicado, diferentes vias, inclusive, a rota de divisão celular (Figura 5). Embora ainda os mecanismos subjacentes não estejam totalmente elucidados, acredita-se que alterações epigenéticas, como modificações na cromatina, são requeridas durante a desdiferenciação (GRAFI; BARAK, 2015; JIANG *et al.*, 2015), possibilitando o acesso para a regulação transcricional por reguladores de crescimento provenientes do meio de cultura, e a conseqüente ativação ou repressão de genes específicos, muitos deles relacionados à iniciação da divisão celular (ROSE, 2016).

Readquirida a totipotência, as células se tornam competentes para responderem a sinais apropriados de desenvolvimento e, então, determinadas a seguirem a rota embriogênica (FEHÉR, 2015) (Figura 5).

A formação de embriões somáticos pode ser direta ou indiretamente (ver tópico 2.3), essa última por meio de massas celulares desorganizadas (calos), que podem

evoluir para massas proembriogênicas, ou seja, grupos de células com citoplasma denso (*stem cells* embriogênicas ou totipotentes) de onde os embriões somáticos são derivados (ROSE, 2016) (Figura 5). Vale salientar que os calos são considerados manifestações do estado celular de dediferenciação (FEHÉR, 2015), ou ainda, podem ser oriundos de *stem cells* que envolvem, geralmente, tecidos vasculares de diferentes órgãos da planta (YANG *et al.*, 2010; SUGIMOTO; GORDON; MEYEROWITZ, 2011) (Figura 5), sem etapa prévia de dediferenciação.

Salienta-se que após a iniciação da embriogênese somática, o processo se torna autorregulatório e pode prover os sucessivos estádios da via embriogênica sem ou com contribuição ínfima de sinais externos, requerendo atividades simultâneas de sinalização e vias genéticas (SMERTENKO; BOZHKOV, 2014).

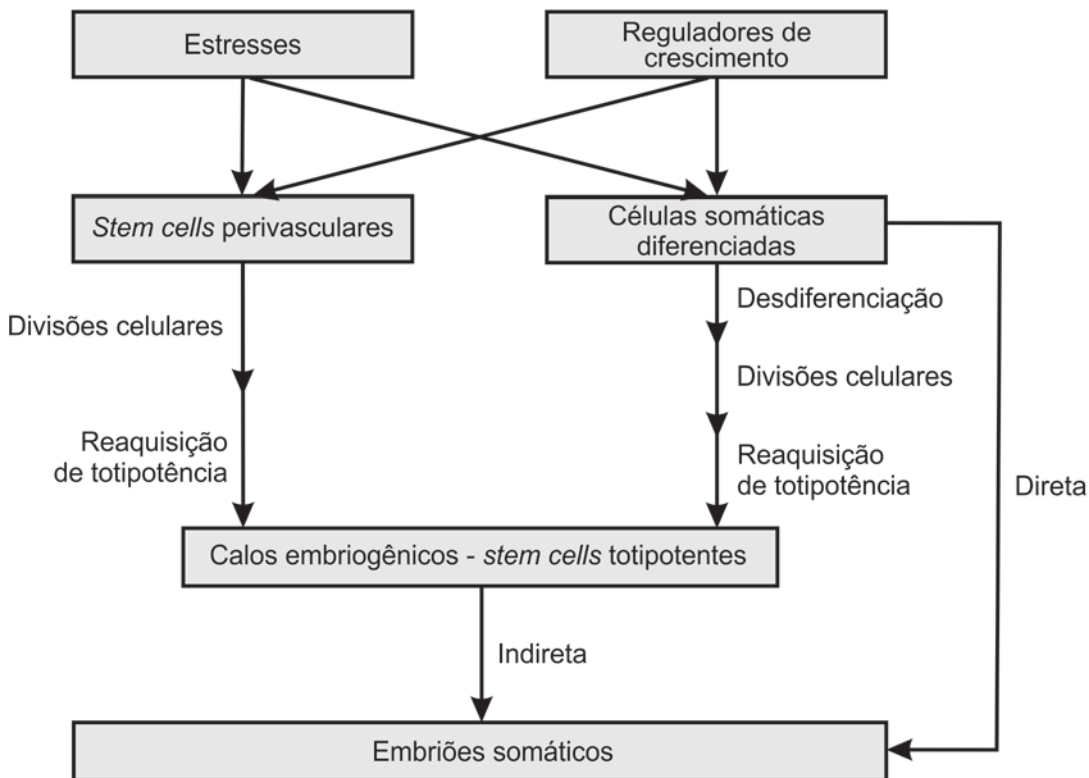


Figura 5. Diagrama esquemático das vias da embriogênese somática *in vitro*. Adaptado de Fehér (2015) e Rose (2016).

De forma geral, o processo de transição de células somáticas para embriogênicas envolve a dediferenciação de células, ativação do ciclo de divisão celular e

reorganização da fisiologia, metabolismo e dos padrões de expressão gênica (FEHÉR; PASTERNAK; DUDITS, 2003; YANG; ZAHNG, 2010).

Atualmente, várias classes de genes relacionados com a embriogênese somática têm sido identificadas, com destaque para o gene SERK (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase*), considerado marcador da competência embriogênica em diferentes espécies de plantas (SCHMIDT *et al.*, 1997; TALAPATRA *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2017; SOARES *et al.*, 2018), e para vários genes reguladores do desenvolvimento vegetal, como WUSCHEL (WUS), LEAFY COTYLEDON 1 (LEC1) e BABY BOOM (BBM) (YANG; ZHANG 2010; FEHÉR, 2015; ROSE, 2016; revisado por HORSTMAN; BEMER; BOUTILIER, 2017; revisado por KUMAR; STADEN, 2017; MAGNANI *et al.*, 2017). De acordo com Mahdavi-Darvari, Noor e Ismanizan (2014), a identificação e caracterização de genes marcadores para embriogênese somática possibilita, além da determinação do potencial embriogênico de células somáticas previamente ao surgimento de marcadores morfológicos, o fornecimento de informações sobre a regulação molecular durante os estádios iniciais do processo embriogênico.

Além da identificação de genes, estudos proteômicos têm sido realizados para investigar o perfil proteico durante a embriogênese somática: proteínas diferencialmente expressas na transição de células somáticas para embriogênicas, em calos embriogênicos e não embriogênicos, em embriões somáticos comparativamente a embriões zigóticos, em embriões somáticos de origem secundária e em embriões somáticos com habilidades diferentes de conversão, em várias espécies de plantas (BABA *et al.*, 2008; TCHORBADJIEVA, 2016; ZHU *et al.*, 2017; QUINGA *et al.*, 2018), inclusive, em palmeiras (SGHAIER-HAMMAMI; DRIRA; JORRIN-NOVO, 2009; SILVA *et al.*, 2014). Esses estudos têm revelado a existência de um sistema molecular complexo durante a embriogênese somática, responsável por controlar diversos processos, tais como desintoxicação enzimática de espécies reativas ao oxigênio, metabolismo energético, síntese e processamento de proteínas, divisão celular, dentre outros (TCHORBADJIEVA, 2016).

2.2 Fatores indutores da embriogênese somática: reguladores de crescimento e estresses

Uma das características mais marcantes da embriogênese somática consiste na variedade de fatores físicos e químicos indutores do processo, que incluem reguladores de crescimento, notadamente, auxinas e citocininas (níveis celulares internos e/ou externos), e/ou variados tratamentos de estresse (FEHÉR, 2006; KARAMI; SAID, 2010; ZAVATTIERI *et al.*, 2010; FEHÉR, 2015; NIC-CAN *et al.*, 2016), como osmótico (KARAMI *et al.*, 2006; YOU; YI; CHOI, 2006; TAO *et al.*, 2012; MOON *et al.*, 2015; MUILU-MÄKELÄ *et al.*, 2015), salino (IBRAHEEM; PINKER; BÖHME, 2012; TAHA; HASSAN, 2014; AL-KHAYRI; IBRAHEEM, 2014), hídrico (AL-KHAYRI; IBRAHEEM, 2014; PEREIRA *et al.*, 2016), de temperatura (KAMADA *et al.*, 1994; KIKUCHI *et al.*, 2006; MOON *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2016), metais pesados (PATNAIK; MAHALAKSHMI; KHURANA, 2005), ferimentos (SANTAREM; PELISSIER; FINER, 1997; CHEONG *et al.*, 2002; MOZGOVÁ; MUÑOZ-VIANA; HENNING, 2017), nutricional (MIHALJEVIC *et al.*, 2011; MOON *et al.*, 2015; KRISHNAN; SIRIL, 2017) e oxidativo (ZHOU *et al.*, 2016), dentre outros. Gaj (2004) aponta, que além da escolha adequada do explante, que deve ser uma fonte de células competentes, a determinação dos fatores indutores como pré-requisitos para o sucesso do estabelecimento de um sistema de embriogênese somática.

Os reguladores de crescimento e estressores diversos desempenham um papel central na mediação das cascatas de transdução de sinal que conduz à reprogramação gênica (DUDITS; BÖGRE; GYÖRGYÉY, 1991). Este fato resulta em uma série de divisões celulares que induzem o crescimento polarizado ou crescimento desorganizado de calos, levando à embriogênese somática direta e indireta, respectivamente (SHARP *et al.*, 1980; DUDITS; BÖGRE; GYÖRGYÉY, 1991).

É bem provável que essa reprogramação gênica, expressão e repressão de determinados genes, esteja intimamente relacionada com alterações no grau de compactação da cromatina, por processos epigenéticos, como modificações nas histonas e metilação de DNA (SCHONES; ZHAO, 2008; TAMARU, 2010).

A metilação de DNA em específico, caracterizada pela adição do grupo metil ao carbono número 5 da base nitrogenada citosina (HE; CHEN; ZHU, 2011; KUMAR; STADEN, 2017), é afetada por outros fatores além da presença/ausência de auxinas e estresses, como a idade das linhagens de células, estado fisiológico e composição

genética do explante, componentes do meio de cultivo, compostos secretados no meio de cultura e condições ambientais de cultivo (DE-LA-PEÑA *et al.*, 2015; ISAH, 2016).

Acredita-se que a hipometilação está associada a tecidos embriogênicos (calos embriogênicos exibem menor grau de metilação de DNA do que aqueles não embriogênicos), sendo considerada por De-la-Peña *et al.* (2015) um pré-requisito para o sucesso da indução da embriogênese somática, e que a hipermetilação está relacionada com a progressão da embriogênese somática (ISAH, 2016). Vale ressaltar, no entanto, que essas afirmações não se verificam na totalidade de casos reportados (ISAH, 2016) e que os mecanismos de como essa alteração epigenética afeta o processo de embriogênese somática ainda não estão totalmente elucidados (DE-LA-PEÑA *et al.*, 2015).

É sabido que auxinas e citocininas são consideradas reguladores centrais dos processos de divisão, bem como, desdiferenciação e rediferenciação celular, envolvidos na aquisição de competência embriogênica (ZENG *et al.*, 2007). Dentre esses reguladores, as auxinas se destacam como o regulador de crescimento vegetal mais amplamente utilizado na indução da embriogênese somática, bem como na indução de calos e no controle da regeneração de órgãos (NIC-CAN; LOYOLA-VARGAS, 2016).

Em diversas famílias de plantas, não diferente para *Arecaceae*, análogos de auxinas têm exercido papel crucial no processo embriogênico (VIÑAS; JIMÉNEZ, 2011), sobretudo o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (FEHÉR; PASTERNAK; DUDITS, 2003; KARAMI; SAID, 2010; NIC-CAN; LOYOLA-VARGAS, 2016), usualmente empregado em altas concentrações na fase de indução em diferentes palmeiras, como *Cocos nucifera* (KARUNARATNE; PERIYAPPERUMA, 1989; SANÉ *et al.*, 2006; NGUYEN *et al.*, 2015; SANDOVAL-CANCINO *et al.*, 2016), *E. guineensis* (TEIXEIRA; SONDAHL; KIRBY, 1993; GUEDES *et al.*, 2011) e *Phoenix dactylifera* (TISSERAT, 1979; VERAMENDI; NAVARRO, 1996; OTHMANI *et al.*, 2009; SANÉ *et al.*, 2012; KURUP *et al.*, 2014; MAZRI *et al.*, 2017). Saleh e Scherwinski-Pereira *et al.* (2016) ressaltam que de um total de 20 protocolos de embriogênese somática de palmeiras analisados a partir de artigos publicados no intervalo de 2000 a 2015, 70% desses utilizaram a auxina 2,4-D na indução embriogênica.

A alta eficácia embriogênica das auxinas, especificamente do 2,4-D, pode ser consequência do duplo papel exercido por esse regulador, uma vez que, se porta como uma auxina, agindo de forma direta ou modificando o metabolismo intracelular de

auxinas endógenas (FEHÉR; PASTERNAK; DUDITS, 2003; KIKUCHI *et al.*, 2006); por outro lado, o 2,4-D também se configura como um agente estressor (BHAT *et al.*, 2015; NIC-CAN; LOYOLA-VARGAS, 2016). Segundo Karami e Said (2010), quando auxinas exógenas são aplicadas, elas se comportam mais como agentes estressores do que reguladores propriamente ditos, questão sustentada pela expressão compartilhada de genes em resposta a auxinas e a diferentes estresses abióticos.

A relação entre diferentes estressores e embriogênese somática tem sido amplamente explorada nos últimos anos, principalmente, com a descoberta de genes compartilhados entre embriogênese somática e vias de sinalização de resposta a estresses (DAVLETOVA *et al.*, 2001; GLIWICKA *et al.*, 2013; JIN *et al.*, 2014; LELJAK-LEVANIĆ; MIHALJEVIC; BAUER, 2015; WICKRAMASURIYA; DUNWELL, 2015; CHENG *et al.*, 2016; FRAGA *et al.*, 2016a; NOWAK; GAJ, 2016); o que sugere que a embriogênese somática seja uma resposta de adaptação do genoma vegetal ao estresse do cultivo *in vitro* (DUDITS *et al.*, 1995; KARAMI; SAID, 2010; JIN *et al.*, 2014; DE-LA-PEÑA *et al.*, 2015; NOWAK; GAJ, 2016). De acordo com Fehér (2015), embora essa visão do papel do estresse sobre a embriogênese somática atualmente seja amplamente aceita, os mecanismos subjacentes ainda não estão totalmente elucidados. Conforme Altamura *et al.* (2016), quando o grau de estresse excede a tolerância celular, as células colapsam e morrem, por outro lado, quando o nível de estresse é menor, ocorre incremento da atividade metabólica e indução do processo de adaptação, incluindo a reprogramação da expressão gênica e a reorganização celular.

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 3,6 dicloro-2-metoxibenzoico (Dicamba) (CHEHMALEE; TE-CHATO, 2008; WANG; CHEN; CHANG, 2010) e ácido 4-amino-3, 5, 6-tricloropicolínico (Picloram) (KARUN *et al.*, 2004; STEINMACHER; CLEMENT; GUERRA, 2007; THUZAR *et al.*, 2011; 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 + Picloram (YUSNITA; HAPSORO, 2011; JAYANTHI *et al.*, 2015). O Picloram, por exemplo, tem proporcionado bons resultados na indução da embriogênese somática em *Bactris gasipaes* (VALVERDE; ARIAS; THORPE, 1987; STEINMACHER; CLEMENT; GUERRA, 2007; STEINMACHER *et al.*, 2007a, b), *Calamus merrillii* e *C. subinermis* (GOH *et al.*, 1999; GOH *et al.*, 2001) e *Euterpe*

oleracea (SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2012). Já o Dicamba foi efetivo na indução de calos em *Areca catechu* (WANG *et al.*, 2003).

Vale salientar também relatos do uso de citocininas como 6-benzilaminopurina (BAP), 2-isopentenladenina (2-iP) e Thidiazuron (TDZ), comumente em baixas concentrações, combinadas ou não com auxinas, na indução da embriogênese somática em palmeiras (GALLO-MEAGHER; GREEN, 2002; ESHRAGHI; ZARGHAMI; MIRABDULBAGHI, 2005; ALMEIDA; ALMEIDA, 2006; PERERA *et al.*, 2009; BOUFIS *et al.*, 2014; ALI; ALI, 2015; ZAYED; ELBAR, 2015; MAZRI *et al.*, 2017). De acordo com Bhatia e Bera (2015), dentre as citocininas, o TDZ destaca-se como uma das mais utilizadas na embriogênese somática.

Outra classe de reguladores de crescimento, as poliaminas, também tem proporcionado bons resultados em trabalhos de embriogênese somática em palmeiras, como em *C. nucifera* (ADKINS *et al.*, 1998; RAJESH *et al.*, 2014), *P. dactylifera* (HEGAZY; ABOSHAMA, 2010) e *E. guineensis* (RAJESH *et al.*, 2003; CORRÊA *et al.*, 2016). Vários autores também relatam efeitos positivos da aplicação exógena de poliaminas nas várias fases da embriogênese somática em espécies de outras famílias botânicas, como em *Panax ginseng* (KEVERS *et al.*, 2000), *Daucus carota* (TAKEDA *et al.*, 2002), *Momordica charantia* (PAUL; MITTER; RAYCHAUDHURI, 2009), *Brassica napus* (AHMADI *et al.*, 2014), *Gossypium hirsutum* (CHENG *et al.*, 2015), *Saccharum sp.* (REIS *et al.*, 2016) e *Oryza sativa* (TAN *et al.*, 2017). Por outro lado, há relatos de que a aplicação exógena de poliaminas não promove efeitos na embriogênese somática, como o observado em *Picea abies* (VONDRÁKOVÁ *et al.*, 2015) ou causa efeitos inibitórios em alguma fase específica do processo, como o mencionado em *Mangifera indica* (LITZ; SHAFFER, 1987) e em *Solanum melongena* (FOBERT; WEBB, 1988).

Os efeitos fisiológicos das poliaminas na embriogênese somática ainda continuam pouco elucidados (CHENG *et al.*, 2015; REIS *et al.*, 2016), sendo comumente relacionados à divisão celular (PAUL; MITTER; RAYCHAUDHURI, 2009) e rápido crescimento (KACKAR; SHEKHAWAT, 2007), alongamento celular e desenvolvimento de centros meristemáticos (CVIKROVÁ *et al.*, 1998), e ainda proteção contra o ambiente estressante *in vitro* (REIS *et al.*, 2016).

Essa versatilidade de fatores indutivos pode ser parcialmente explicada pela interação da condição indutiva com os níveis endógenos de hormônios nos explantes (JIMÉNEZ, 2001, 2005), com destaque para os hormônios ácido indol-3-acético (AIA)

e o ácido abscísico (ABA), considerados cruciais na determinação do potencial embriogênico dos explantes (GAJ, 2004).

Os níveis endógenos de giberelina (GA), por outro lado, exibem relação negativa com a embriogênese somática segundo Wang *et al.* (2013), Altamura *et al.* (2016) e Zayed *et al.* (2016). Além desses hormônios, o etileno, comumente sintetizado em resposta a vários estresses, bióticos e abióticos (WANG; LI; ECKER, 2002), também tem se destacado, embora o seu papel na embriogênese somática ainda não esteja totalmente elucidado, em função dos resultados ambíguos, inibidor/promotor, relatados em diferentes espécies e sistemas de cultura (ALTAMURA *et al.*, 2016). Bai *et al.* (2013) sugeriram que os efeitos do etileno na formação de embriões somáticos dependem da origem genética dos explantes e das condições de cultivo. Segundo Loyola-Vargas e Ochoa-Alejo (2016), esses dois últimos hormônios desempenham papéis mais relevantes nos estádios finais da embriogênese.

Ooi *et al.* (2012), em estudo com *E. guineensis* objetivando correlacionar o potencial para embriogênese somática de explantes foliares com alterações na expressão de genes responsivos a hormônios, sugeriram que os níveis endógenos de auxinas podem ser maiores em palmeiras altamente embriogênicas. Em oposição, Zhou *et al.* (2017), em *Cunninghamia lanceolata*, reportaram uma relação inversamente proporcional entre níveis de auxinas endógenas e competência embriogênica. Embora haja vários relatos do incremento de hormônios endógenos em sistemas embriogênicos, esses hormônios internos não são os únicos fatores envolvidos na determinação da especificidade resposta/estímulo indutor e, aparentemente, não são marcadores adequados do potencial embriogênico em explantes que o comportamento *in vitro* é desconhecido (JIMÉNEZ, 2001).

2.3 Rotas de desenvolvimento e origens uni e multicelular de embriões somáticos

A formação de embriões somáticos pode ser obtida por meio de duas rotas de desenvolvimento: direta ou indireta. Na embriogênese somática direta, as células já apresentam competência embriogênica, células pré-embriogênicas determinadas, e requerem uma reprogramação gênica mínima para a formação do embrião, sem etapa de desdiferenciação (SHARP *et al.*, 1980; WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986; YEUNG, 1995). Certamente por apresentarem genes relacionados à totipotência acessíveis à

transcrição (HORSTMAN; BEMER; BOUTILIER, 2017), diferentemente do que ocorre na embriogênese somática indireta. Nesta, as células requerem uma reprogramação gênica maior para aquisição do estado de competência embriogênica, indução de células embriogênicas determinadas, que é precedido pela proliferação de células - calos (SHARP *et al.*, 1980; WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986; YEUNG, 1995). Segundo Sharp *et al.* (1980) e Williams e Maheswaran (1986), na embriogênese somática indireta, os reguladores de crescimento têm papel crucial para a reentrada no processo de divisão celular, bem como na determinação do estado embriogênico.

Os principais fatores envolvidos em cada rota, por sua vez, dependem da fonte e do estado fisiológico do explante utilizado (WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986) e do tipo e concentração dos reguladores de crescimento de plantas adicionados ao sistema (QUIROZ-FIGUEROA *et al.*, 2006; TAGIPUR *et al.*, 2016). Conforme Horstman, Bemer e Boutilier (2017), parece que a definição da ocorrência da embriogênese somática direta ou indireta está mais relacionada à combinação do contexto de desenvolvimento do explante com o ambiente de cultivo, do que propriamente com a distância de desenvolvimento do estado embrionário.

Esse modelo de embriogênese, com formação prévia de agregados celulares ou calos (massas de células desorganizadas, com diferentes graus de diferenciação) (IKEUCHI; SUGIMOTO; IWASE, 2013; PERIANEZ-RODRIGUEZ; MANZANO; MORENO-RISUENO, 2014), insere no contexto o conceito da rediferenciação celular, caracterizado como a regeneração de plantas a partir de calos, provenientes da desdiferenciação de células somáticas ou a partir de células meristemáticas pré-existentes (BHOJWANI; DANTU, 2013).

Durante a embriogênese somática indireta, tanto calos embriogênicos, capazes de formar embriões somáticos, quanto não embriogênicos, são formados e são distinguíveis por aspectos relacionados especialmente à morfologia e coloração (NA *et al.*, 2007; VON ARNOLD *et al.*, 2002; QUIROZ-FIGUEROA *et al.*, 2006; YANG; ZAHNG, 2010; BORJI *et al.*, 2017), os quais, inclusive, variam entre as espécies. Shang *et al.* (2009) ressaltam ainda que diferenças óbvias no padrão do arranjo celular na superfície do calo, nas características histológicas, bem como na ultraestrutura citológica podem ser potencialmente investigadas de forma comparativa entre células de calos embriogênicos e de calos não embriogênicos. Nesse contexto, salienta-se a relevância da realização de estudos histológicos para melhor caracterização de eventos

morfogênicos que levam à sistemas embriogênicos somáticos eficientes (ROCHA *et al.*, 2016).

Células de calos embriogênicos usualmente apresentam características específicas típicas de células meristemáticas (HALPERIN; JENSEN, 1967; TALAPATRA *et al.*, 2016), como formato isodiamétrico, conteúdo citoplasmático denso (PUROHIT, 2013), tamanho reduzido, núcleos grandes com nucléolos proeminentes (NAMASIVAYAM, 2007), vacúolos pequenos/fragmentados (HALPERIN; JENSEN, 1967; YANG; ZAHNG, 2010) e acúmulo de amido (WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986; YEUNG, 1995). Ademais, são células metabolicamente ativas, com intensa atividade mitogênica (YEUNG, 1995; PETREK *et al.*, 2015).

Contudo, alguns autores têm proposto que células meristemáticas se distinguem de células embriogênicas em características ultraestruturais relacionadas aos núcleos, de modo que, as meristemáticas apresentam núcleos esféricos e com muitos nucléolos, enquanto que as embriogênicas exibem núcleos com formato irregular e um único proeminente nucléolo (VERDEIL *et al.*, 2007). Ainda segundo esses autores, células embriogênicas exibem pouca heterocromatina e alta eucromatina, exatamente o oposto do observado em células meristemáticas. Apesar das diferenças supracitadas, os dois termos têm sido utilizados como sinônimos em uma parte significativa da literatura.

Células embriogênicas, diferentemente das não embriogênicas, exibem aspectos diferenciados com relação à parede celular, como presença de matriz extracelular composta por material fibrilar (SAMAJ *et al.*, 1999; VERDEIL *et al.*, 2001; SHANG *et al.*, 2009; PAN *et al.*, 2011; BETEKHTIN *et al.*, 2016; BORJI *et al.*, 2017), presença de calose (β - 1,3 - glucanas) (YOU; YI; CHOI, 2006; TESTILLANO; RISUEÑO, 2009; TAO *et al.*, 2012; MAZRI *et al.*, 2013), além de padrões particulares de distribuição de pectinas (ENDRESS *et al.*, 2009) e do seu grau de metil-esterificação (VERDEIL *et al.*, 2001; TESTILLANO; RISUEÑO, 2009). Conforme Malinowski e Filipecki (2002), a parede celular participa ativamente do processo embriogênico atuando na transdução de sinais, bem como na formação de tensões que influenciam o formato da célula e o plano de divisão celular.

Já células de calos não embriogênicos geralmente são vacuoladas (RONCHI; GIORGETTI, 1995; SAMAJ *et al.*, 1999; KURCZYNSKA *et al.*, 2012; BORJI *et al.*, 2017), alongadas (PASTERNAK *et al.*, 2002), dispersas, com baixa relação núcleo/citoplasma (SILVEIRA *et al.*, 2013) e com poucas organelas (NA *et al.*, 2007),

que segundo Carvalho *et al.* (2013), pode ser interpretado como indicativo de baixa atividade metabólica.

Adicionalmente, análises bioquímicas referentes às concentrações de hormônios endógenos, como AIA, ABA e poliaminas, componentes fenólicos e aminoácidos podem ser utilizados para melhor distinção entre linhagens de calos embriogênicos e calos não embriogênicos, como realizado por Nascimento-Gavioli *et al.* (2017) em *B. gasipaes*. Análises moleculares comparativas também têm sido realizadas, como aquela efetuada por Magnani *et al.* (2017) em *Arabidopsis*. Conforme esses autores, células embriogênicas diferentemente daquelas típicas de calos em proliferação, e, portanto, não embriogênicas, frequentemente, reprimem vias metabólicas e genes relacionados à formação de raízes, ao passo que ativam genes relacionados, por exemplo, à reorganização celular.

Em palmeiras, a maioria dos estudos menciona a ocorrência de embriogênese somática indireta (VIÑAS; JIMÉNEZ, 2011), como verificado em *C. nucifera* (SAÉNZ *et al.*, 2006), *Acrocomia aculeata* (MOURA *et al.*, 2009) e *E. guineensis* (BALZON; LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2013). Embriões somáticos provenientes da via indireta exibem alta probabilidade de origem multicelular (GAJ, 2004), fato observado nos trabalhos supracitados. A origem de embriões somáticos via unicelular também tem sido relatada em palmeiras (KANCHANAPOOM; DOMYOAS, 1999; LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2014), assim como as duas vias em um mesmo sistema de regeneração como reportado em *B. gasipaes* (ALMEIDA *et al.*, 2012), *E. oleracea* (SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2012) e *P. dactylifera* (SANÉ *et al.*, 2006).

Vale mencionar que tanto a embriogênese somática direta quanto indireta pode ser derivada de uma única célula ou de várias células (QUIROZ-FIGUEROA *et al.*, 2006) e que as primeiras divisões necessárias à formação do embrião somático, frequentemente, não têm sido observadas com detalhes, já que a célula ou o grupo de células a partir do qual o embrião é originado nem sempre é de fácil identificação (WINKELMANN, 2016).

Conforme Almeida *et al.* (2012), os embriões originados via unicelular (divisão assimétrica de uma única célula) são consequentes do descolamento precoce dos tecidos de origem em função da ruptura da epiderme e se formam a partir de células externas dos tecidos, apresentando fácil desprendimento do tecido materno e, em alguns casos, exibem suspensor. Por outro lado, aqueles oriundos da via multicelular são formados internamente por um grupo de células meristemáticas, o que dificulta o isolamento do

explante. De acordo com Puigderrajols, Mir e Molinas (2001), a origem do embrião somático é um aspecto pertinente no que diz respeito à uniformidade genética das plantas resultantes, de modo que, a origem unicelular é mais desejada. Dentro dessa conjuntura, ressalta-se mais uma vez a importância da realização de estudos histológicos para o detalhamento dos eventos ocorridos durante a embriogênese somática.

Embora a embriogênese somática direta seja menos frequente em palmeiras, assim como na maioria das famílias de plantas (GAJ, 2004), essa rota embriogênica apresenta as vantagens adicionais de redução do tempo necessário à propagação vegetal (EL BAR; EL DAWAYATI, 2014), bem como decréscimo da ocorrência de variações genéticas (variação somaclonal) (SIVANESAN; LIM; JEONG, 2011; JAYANTHI *et al.*, 2011; IBRAHIM *et al.*, 2013). Além de ausência de acúmulo de compostos fenólicos no meio e taxas de contaminação geralmente baixas (MUNISWAMY; SREENATH, 1996; HERRERA *et al.*, 2011).

Em palmeiras, dentre os relatos de obtenção de embriões somáticos sem a fase intermediária de calos, citam-se Jayanthi *et al.* (2011) a partir de nós cotiledonares de *E. guineensis* e Sarasan, Ramsay e Roberts (2002) utilizando como explantes haustório, plúmula e radícula de mudas de *Hyophorbe lagenicaulis*. Embriogênese somática direta também foi relatada em *P. dactylifera* por Sidky e Eldawyati (2012) a partir de inflorescências imaturas e por El Bar e El Dawayati (2014) a partir de explantes foliares jovens. Salienta-se que apesar desses registros, a embriogênese somática direta em palmeiras carece de investigações mais detalhadas.

Um tipo específico de embriogênese somática, a embriogênese somática secundária caracterizada pela produção de embriões somáticos a partir de embriões somáticos primários (RAEMAKERS; JACOBSEN; VISSER, 1995; TE-CHATO; HILAE, 2007; ELMEER, 2013; ROCHA *et al.*, 2016), também tem sido descrita em algumas espécies de palmeiras: *A. catechu* (WANG; CHEN; CHANG, 2010), *B. gasipaes* (STEINMACHER *et al.*, 2011), *C. merrillii* e *C. subinermis* (GOH *et al.*, 2001), *C. nucifera* (BUFFARD-MOREL; VERDEIL; PANNETIER, 1992; PÉREZ-NÚÑEZ *et al.*, 2006), *E. edulis* (GUERRA; HANDRO, 1991), *E. oleracea* (FREITAS *et al.*, 2016), *E. guineensis* (RAJESH *et al.*, 2003) e *P. dactylifera* (OTHMANI *et al.*, 2009). De acordo com Raemakers, Jacobsen e Visser (1995), esse tipo de embriogênese, comparativamente à embriogênese primária, apresenta as vantagens de melhorar as taxas de multiplicação, repetibilidade, independência da fonte de explante e manutenção da capacidade embriogênica por intervalos relativamente longos de tempo, por meio de

ciclos repetidos de embriogênese secundária. Além do que, embriões obtidos via embriogênese somática secundária, frequentemente, podem exibir melhor desenvolvimento do que aqueles obtidos via embriogênese somática primária (PÉREZ-NÚÑEZ *et al.*, 2006).

2.4 Fases da embriogênese somática

De modo geral, protocolos de embriogênese somática de palmeiras envolvem as seguintes fases: indução, diferenciação, maturação, germinação/conversão e aclimatização. Vale salientar, que nem todos os protocolos de embriogênese somática em palmeiras fazem diferenciação entre as etapas, determinando tratamentos diferentes para cada uma delas. Inclusive, há na literatura confusão com relação aos termos utilizados para nomeá-las, muito por conta do assincronismo típico do processo de embriogênese somática.

Os calos contendo células embriogênicas consequentes da fase de indução, mediada por reguladores de crescimento e/ou diferentes estresses, geralmente, proliferam e formam massas proembriogênicas (HALPERIN, 1966; VON ARNOLD *et al.*, 2002; YANG; ZAHNG, 2010). Essas massas são caracterizadas, normalmente, pelo isolamento físico ou fisiológico de seus arredores imediatos devido ao espessamento da parede celular (calose) (DUBOIS *et al.*, 1990) e da ausência ou redução do número de plasmodesmas (VERDEIL *et al.*, 2001). Segundo Verdeil *et al.* (2001), esse isolamento físico pode facilitar a reprogramação das funções genômicas e celulares necessárias à aquisição de totipotência e competência embriogênica. Vale mencionar que o isolamento celular não é regra em sistemas embriogênicos *in vitro*.

Essas massas embriogênicas podem ser subcultivadas em meios com níveis reduzidos de reguladores de crescimento (BOTTI; VASIL, 1984; GOH *et al.*, 2001; QUIROZ-FIGUEROA *et al.*, 2006; REE; GUERRA, 2015) ou desprovidos deles (VRIES *et al.*, 1988; KAWAHARA; KOMAMINE, 1995; REE; GUERRA, 2015; QUIROZ-FIGUEROA *et al.*, 2006). A redução ou remoção de reguladores inibe a proliferação e promove um gradiente polar de auxina (JIMÉNEZ, 2001, 2005), estimulando a formação de embriões somáticos e o seu desenvolvimento inicial (KAWAHARA; KOMAMINE, 1995; VON ARNOLD *et al.*, 2002; SU *et al.*, 2009). Além do mais, a consequência da remoção da auxina do meio tem sido associada a eventos epigenéticos, como hipometilação de DNA, o que permite o posterior

desenvolvimento do embrião (MUNKSGAARD, MATTSSON; OKKELS, 1995). Fehér (2006) hipotetiza que a determinação embriogênica é alcançada na presença da auxina exógena, todavia, a sua presença contínua bloqueia o desenvolvimento posterior do embrião somático, ou seja, a determinação para a via da embriogênese somática ocorre antes da remoção do regulador de crescimento do meio de cultivo.

Essa abordagem, redução ou remoção do regulador de crescimento, é definida por alguns autores como a fase de diferenciação de embriões somáticos, e tem sido usada com sucesso em *B. gasipaes* (STEINMACHER; CLEMENT; GUERRA, 2007), *E. guineensis* (BALZON; LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2013; JAYANTHI *et al.*, 2015) e *A. aculeata* (LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2014).

Uma vez diferenciados, os embriões somáticos passam então por um processo de amadurecimento, caracterizado comumente, por mudanças bioquímicas e morfológicas (VON ARNOLD *et al.*, 2002). Essa fase de maturação, marcada pela expansão rápida dos cotilédones e síntese e acúmulo de compostos de reserva, é considerada crucial para a conversão bem-sucedida dos embriões somáticos em plântulas (MISHRA; SANYAL; AMLA, 2012).

Assim, um processo insuficiente de maturação, caracterizado geralmente, por uma germinação precoce, acarreta no desenvolvimento de plântulas pouco desenvolvidas (JIMÉNEZ, 2005). Para contornar essa problemática corriqueira em embriões somáticos de diferentes famílias de plantas, se tem adotado a suplementação de meios com reguladores de crescimento, como ABA (VON ARNOLD *et al.*, 2002; JIMÉNEZ, 2005; OTHMANI *et al.*, 2009; RAI *et al.*, 2011; FRAGA *et al.*, 2016b), embora essa não seja uma prática comum em palmeiras (REE; GUERRA, 2015).

Salienta-se ainda que o acúmulo de substâncias de reserva é uma fase típica do desenvolvimento embrionário, portando-se como um excelente marcador da qualidade e fidelidade da embriogênese somática (MERKLE; PARROTT; FLINN, 1995). Entretanto, embriões somáticos de muitas espécies de palmeiras apresentam produção deficitária de alguns desses compostos de reserva, como proteínas (SANÉ *et al.*, 2006; ABERLENC-BERTOSSI *et al.*, 2008; SGHAIER *et al.*, 2008; MOURA; VENTRELLA; MOTOIKE, 2010). Essa produção anormal de proteínas, segundo Merkle, Parrott e Flinn (1995), é consequência dos tipos de estratégias para maturação utilizadas durante o desenvolvimento do embrião somático e não um problema inerente à embriogênese somática. Essa questão levanta a necessidade de otimização de

metodologias para maturação em palmeiras, as quais permanecem ainda pouco estudadas (REE; GUERRA, 2015).

As etapas posteriores à maturação consistem na germinação, definida como o desenvolvimento do sistema radicular e/ou parte aérea (MERKLE; PARROTT; FLINN, 1995); conversão, conceituada como o desenvolvimento de plântulas a partir de embriões somáticos germinados (VENKATACHALAM *et al.*, 2003) e aclimatização, caracterizada como a transição das plantas das condições *in vitro* para *ex vitro* (BADR; ANGERS; DESJARDINS, 2015). Conforme Maruyama e Hosoi (2016) e Guan *et al.* (2016), a maturação de quantidades consideráveis de embriões somáticos e a eficiência da sua conversão se configuram como fatores limitantes para o uso da técnica em muitas espécies.

Durante as fases de germinação e conversão, há relatos tanto da utilização de reguladores de crescimento, como ácido 3-indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB), ácido 1-naftalenoacético (ANA), ácido giberélico (AG₃), 6-benzilaminopurina (BAP), quanto da ausência deles em diferentes espécies de palmeiras. Em *E. guineensis*, por exemplo, Jayanthi *et al.* (2015) e Gomes, Bartos e Scherwinski-Pereira (2015) relataram o uso de reguladores para fins de enraizamento. A formação de raízes é considerada um aspecto primordial ao processo de conversão, já que supre as necessidades hídricas e nutricionais das plantas após a transferência para condições *ex vitro* (REE; GUERRA, 2015). Já Perera *et al.* (2009) consideraram a adição de AG₃ um passo crucial para a regeneração de *C. nucifera*, semelhante ao relatado por Freitas *et al.* (2016) que adicionaram além de AG₃, BAP durante a regeneração de *E. oleracea*. Por outro lado, reguladores de crescimento não foram necessários em *E. oleracea* (SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2012) e *A. aculeata* (LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2014).

As plantas transplantadas para condições *ex vitro* devem resistir progressivamente ao aumento da luminosidade (fluxo de fótons), à umidade relativa inferior, variação de temperatura e estresses bióticos típicos da nova condição (FKI *et al.*, 2011a). Para tal, diferentes procedimentos têm sido adotados para incrementar a sobrevivência e crescimento de plantas regeneradas a partir de embriões somáticos. Steinmacher, Clement e Guerra (2007), por exemplo, mantiveram plantas de *B. gasipaes* dentro de uma caixa de plástico coberta com vidro para permitir a entrada de luz e reduzir a desidratação. Luis e Scherwinski-Pereira (2014) aclimatizaram plantas de *A. aculeata* mantendo-as cobertas com pequenos sacos plásticos transparentes, com

aumento gradativo na abertura desses, até que as plantas estivessem totalmente aclimatizadas às condições ambientais. Vale salientar, todavia, que por mais precisas e cautelosas sejam as abordagens de aclimatização, 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*.

Ressalta-se que plantas regeneradas a partir de embriões somáticos podem apresentar variação somaclonal, provavelmente, devido à mudanças epigenéticas (DE-LA-PEÑA *et al.*, 2015; KUMAR; STADEN, 2017) que levam à formação de genótipos com características novas, desejáveis ou não. Um fenótipo indesejável, conhecido como fenótipo *mantled*, caracterizado pelo desenvolvimento anormal de flores, tem sido relatado em baixas percentagens em plantas regeneradas de *E. guineensis*, o que tem sido atribuído por alguns autores ao processo de metilação de DNA (JALIGOT *et al.*, 2000; JALIGOT; BEULÉ; RIVAL, 2002; SHEARMAN *et al.*, 2013; ONG-ABDULLAH *et al.*, 2015). Anormalidades em plantas regeneradas a partir de embriões somáticos também têm sido mencionadas em *P. dactylifera* (AL-MAZROUI; ZAID; BOUHOUCHE, 2007; BOUHOUCHE; AL-MAZROU; ZAID, 2007). Dentre essas anormalidades citam-se infertilidade de flores femininas e nanismo (FERRY, 2011).

2.5 Fatores que influenciam a embriogênese somática

Além dos reguladores de crescimento que afetam significativamente as diferentes fases da embriogênese somática, vários outros aspectos influenciam essa técnica de cultivo *in vitro*, dentre os quais citam-se: genótipo (FEHÉR, 2006; KRIAA *et al.*, 2012; CORRÊA *et al.*, 2016; GARROCHO-VILLEGAS; AGUILAR; JIMENÉZ, 2017; AMERI *et al.*, 2018; RAMÍREZ *et al.*, 2018) e fisiologia da planta doadora (LOYOLA-VARGAS, 2016), tipo e estado fisiológico de desenvolvimento de explantes (SHARP *et al.*, 1980; GUERRA; HANDRO, 1991, 1998; KARUNARATNE; CHANDRA; KOVOOR, 1991; LEDO *et al.*, 2002; BHATIA; BERA, 2015; BONGA, 2016; ISAH, 2016), composição do meio de cultura (VIÑAS; JIMÉNEZ, 2011; BHATIA; BERA, 2015; BETTENCOURT *et al.*, 2016; BONGA, 2016; AMERI *et al.*, 2018), o que inclui moléculas orgânicas excretadas pelo explante (NIC-CAN *et al.*, 2015), pH do meio de cultura (LOYOLA-VARGAS, 2016) e a duração das fases do processo, além das condições de cultivo (ELMEER, 2013).

Vale enfatizar que algumas espécies vegetais são menos responsivas (termo não raramente encontrado na literatura como “recalcitrantes *in vitro*”) que outras com relação à iniciação da embriogênese somática e regeneração de plantas (RAO, 1996), fato que engloba algumas espécies (genótipos específicos) de palmeiras, como *C. nucifera* (SOLÍS-RAMOS *et al.*, 2012; JAYARAJ *et al.*, 2015; NGUYEN *et al.*, 2015; KARUN *et al.*, 2017) e *P. dactylifera* (AL-KHAYRI, 2011; SANÉ *et al.*, 2012) e evidencia a necessidade de constante otimização de protocolos e o melhor entendimento das barreiras moleculares que previnem a embriogênese somática a partir de tecidos vegetativos (MOZGOVÁ; MUÑOZ-VIANA; HENNING, 2017). Bonga (2016) menciona que a escolha de explantes com maior capacidade morfogênética pode resolver a questão da recalcitrância em determinadas espécies vegetais.

Com relação ao fator genótipo, especificamente, há relatos evidenciando diferenças na capacidade de genótipos de diversas palmeiras responderem às várias etapas do processo de embriogênese somática (VERDEIL *et al.*, 1994; KARUN *et al.*, 2004; STEINMACHER; CLEMENT; GUERRA, 2007; AL-KHAYRI, 2011; ASLAM *et al.*, 2011; SANÉ *et al.*, 2012), como aquele mencionado por Silva, Luis e Scherwinski-Pereira (2012) em *E. guineensis*. Estes últimos autores salientam a importância da realização da triagem de genótipos mais responsivos à indução da embriogênese somática previamente à realização de estudos básicos de propagação e regeneração. Isah (2016) ressalta que essas diferenças encontradas entre diferentes genótipos na resposta embriogênica podem estar relacionadas às diferenças no grau de alterações epigenéticas, como no nível de metilação de DNA.

Quanto aos explantes utilizados em palmeiras, mencionam-se vários tipos, como: embriões zigóticos (GUERRA; HANDRO, 1988, 1991, 1998; GOH *et al.*, 2001; LEDO *et al.*, 2002; STEINMACHER *et al.*, 2007a; SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2012; BALZON; LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2013; LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2014; FREITAS *et al.*, 2016; SYUHADA; RASID; PARVEEZ, 2016; LUNA *et al.*, 2017); tecidos individuais provenientes de embriões zigóticos, como plúmulas (CHAN *et al.*, 1998; AZPEITIA *et al.*, 2003; FERNANDO *et al.*, 2003; PÉREZ-NÚÑEZ *et al.*, 2006; SAÉNZ *et al.*, 2010; RAJESH *et al.*, 2014; JAYARAJ *et al.*, 2015) e nós cotiledonares (JAYANTHI *et al.*, 2011); tecidos foliares (AHÉE *et al.*, 1981; GOH *et al.*, 2001; FKI *et al.*, 2003; KARUN *et al.*, 2004; YUSNITA; HAPSORO, 2011; KURUP *et al.*, 2014; CONSTANTIN *et al.*, 2015; WIENDI; CONSTANTIN; WACHYAR, 2015; MAZRI *et al.*, 2017); ápices caulinares –

palmeiras produtoras de afilhos (EKE; AKOMEAH; ASEMOTA, 2005; ASLAM *et al.* 2011); ápices radiculares (GOH *et al.*, 1999; GOH *et al.*, 2001; WANG; CHEN; CHANG, 2006; ROSHANFEKRRAD *et al.*, 2017); inflorescências (GUERRA; HANDRO, 1991, 1998; VERDEIL; BUFFARD-MOREL; PANNETIER, 1989; BHASKARAN; SMITH, 1992; FKI *et al.*, 2003; KARUN *et al.*, 2004; ABUL-SOAD; MAHDI, 2010; GUEDES *et al.*, 2011; ABUL-SOAD, 2012; SIDKY; ELDAWYATI, 2012; JAYANTHI *et al.*, 2015; JATOI *et al.*, 2015; SANDOVAL-CANCINO *et al.*, 2016; ZAYED; ELBAR, 2015; AL-ALI *et al.*, 2017; PÁDUA *et al.*, 2017), flores (KRIAA *et al.*, 2012; ZAYED *et al.*, 2016) e ovários não fertilizados (PERERA *et al.*, 2007; PERERA *et al.*, 2009).

De acordo com Gaj (2004), o tipo de explante e o seu estágio de desenvolvimento são, provavelmente, os fatores mais importantes na determinação da capacidade embriogênica de uma cultura. O tamanho, origem e idade do explante determinam sua totipotência e/ou multipotência *in vitro* sob condições ambientais controladas, ou seja, determinam sua capacidade de regeneração (SILVA; DOBRÁNSZKI, 2014).

Dentre os explantes citados, os embriões zigóticos se sobressaem como os explantes mais comumente utilizados, principalmente, por apresentarem as seguintes vantagens: alta responsividade ao cultivo *in vitro*, provavelmente, por apresentarem muitos genes expressos durante a embriogênese zigótica ainda ativos (ISAH, 2016); geralmente, são livres de endófitos e patógenos; são abundantes em muitas espécies e apresentam colheita pouco danosa a planta mãe (REE; GUERRA, 2015). Todavia, protocolos de regeneração a partir de embriões zigóticos apresentam o inconveniente da imprevisibilidade da natureza dos regenerantes (JAYANTHI *et al.*, 2015), dada a polinização cruzada (REE; GUERRA, 2015).

Menciona-se também que exemplos de êxito durante os processos de indução da embriogênese somática e regeneração de plantas de palmeiras, a partir de explantes com menor grau de maturidade, têm sido comuns na literatura. Guerra e Handro (1988, 1991, 1998), Gallo-Meagher e Green (2002), Dias *et al.* (1994) e Scherwinski-Pereira *et al.* (2012), por exemplo, relataram bons resultados a partir de embriões zigóticos imaturos de *E. edulis*, *S. repens*, *G. gamiova* e *E. oleracea*, respectivamente, já Jayanthi *et al.* (2015) a partir de inflorescências imaturas de *E. guineensis*.

As inflorescências imaturas têm se projetado como fontes promissoras de explantes, sobretudo, devido à alta capacidade embriogênica de calos originados (FKI *et*

al., 2011b), além das vantagens adicionais de apresentarem baixa contaminação fúngica e bacteriana (TEIXEIRA; SONDAHL; KIRBY, 1994; ABUL-SOAD, 2011) e da colheita com danos ínfimos à planta mãe (TEIXEIRA; SONDAHL; KIRBY, 1994; JAYANTHI *et al.*, 2015), a depender do conhecimento prévio da disposição das inflorescências na planta mãe e do grau desejado de maturidade das espatas a serem coletadas. Além do mais, o uso desses explantes possibilita a clonagem do material de origem (REE; GUERRA, 2015) e eles exibem produção abundante de inflorescências por muitas espécies.

Segundo Isah (2016), o potencial para indução e obtenção de um número expressivo de embriões somáticos é inversamente proporcional ao grau de maturidade do explante utilizado. Ronchi e Giorgetti (1995) completam afirmando que tecidos imaturos, assim como órgãos próximos ao estágio embriogênico, quando submetidos às condições estressantes, retêm maior capacidade embriogênica e de consequente regeneração de plantas, dada a capacidade de entrar diretamente na fase de reprogramação gênica; tais explantes são considerados ideais para espécies monocotiledôneas (FEHÉR, 2006). Embora na maioria das espécies vegetais a competência embriogênica tem sido associada às células em certos tecidos com origem embrionária (NEUMANN, 2000), segundo Fehér (2006) e Mahdavi-Darvari, Noor e Ismanizan (2014), as células somáticas podem potencialmente recuperar essa competência por meio da formação prévia de calo, como mencionado no tópico 2.3.

Em palmeiras, também tem sido relatado com certo sucesso o seccionamento de explantes, como folhas jovens e meristemas apicais, aplicando-se a técnica *Thin Cell Layers* (TCL), como mencionado em *E. guineensis* (SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2010; GUEDES *et al.*, 2011; BONETTI *et al.*, 2016), *B. gasipaes* (STEINMACHER *et al.*, 2007b; BETTENCOURT *et al.*, 2016) e *A. aculeata* (PADILHA *et al.*, 2015).

Quanto ao tipo de meio de cultivo, de acordo com Viñas e Jiménez (2011), o meio sólido tem sido o mais utilizado na totalidade de etapas dos protocolos de embriogênese somática em palmeiras, embora haja vários relatos do uso de meio líquido em *P. dactylifera* (ZOUINE *et al.*, 2005; SANÉ *et al.*, 2006; BOUFIS *et al.*, 2014; NAIK; AL-KHAYRI, 2016) e em *E. guineensis* (TEIXEIRA *et al.*, 1995; STEINMACHER; CLEMENT; GUERRA, 2007; ROOWI *et al.*, 2010). O meio líquido tem surgido como uma alternativa promissora à propagação *in vitro*, dadas as vantagens adicionais de uniformidade na produção de embriões somáticos (SUMARYONO *et al.*,

2008), redução dos custos para produção de plantas e possibilidade de automatização (NEUMANN; KUMAR; IMANI, 2009).

Adicionalmente, o sistema de imersão temporária, em que culturas são expostas ao meio líquido em determinados intervalos de tempo (REE; GUERRA, 2015; MONJA-MIO *et al.*, 2016), tem sido empregado com êxito na proliferação de calos embriogênicos de *E. guineensis* (MARBUN *et al.*, 2015) e na regeneração de plantas de *B. gasipaes* (STEINMACHER *et al.*, 2011) e *E. guineensis* (GOMES *et al.*, 2016).

Dentre as diferentes formulações de meios basais, o de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), segundo Ree e Guerra (2015), é o mais frequentemente utilizado em estudos em palmeiras. Embora, o meio Y3 estabelecido por Eeuwens em 1976, especificamente para o cultivo de *C. nucifera*, também tem merecido destaque (TEIXEIRA; SONDAHL; KIRBY, 1994; LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2014; JAYANTHI *et al.*, 2015; NGUYEN *et al.*, 2015). Adicionados aos meios basais, a sacarose (30 g.L⁻¹) e carvão ativado se sobressaem como a fonte de carbono e antioxidante comumente utilizados em protocolos de embriogênese somática em diferentes espécies de palmeiras (REE; GUERRA, 2015; SALEH; SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2016).

2.6 Embrião zigótico x embrião somático

Vários autores têm reportado semelhanças, em diferentes aspectos, entre embriões zigóticos e embriões somáticos (CROUCH *et al.*, 1982; RONCHI; GIORGEITI, 1995; YEUNG, 1995; DODEMAN; DUCREUX; KREIS, 1997; KÄRKÖNEN, 2000; BANDYOPADHYAY; HAMILL, 2003; GAJ, 2004; HARADA; BELMONTE; KWONG, 2010; ROCHA *et al.*, 2012; JIN *et al.*, 2014; WINKELMANN, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2017). Imediatamente antes da formação do embrião propriamente dito, já pode-se citar como primeira similaridade, o fato do zigoto ser semelhante em constituintes citoplasmáticos e atividade metabólica às células consideradas embriogênicas nos sistemas *in vitro* (YEUNG, 1995).

Além do mais, ambos os embriões são iniciados por meio da divisão assimétrica de uma célula em particular (DODEMAN; DUCREUX; KREIS, 1997; GAJ, 2004), o que inicia o estabelecimento da assimetria apical-basal. O domínio apical, embrião propriamente dito, se prolifera mediante um conjunto de divisões coordenadas e origina uma plântula, enquanto o domínio basal, o suspensor do embrião, é diferenciado e

gradualmente removido via morte celular programada por colapso vacuolar, processo considerado crucial para o desenvolvimento normal do embrião zigótico (SMERTENKO; BOZHKOVA, 2014). Vale salientar, no entanto, que durante a formação de embriões somáticos na maioria das espécies de plantas, com exceção das coníferas, o suspensor geralmente não é de fácil visualização ou, simplesmente, não é formado (WINKELMANN, 2016), e que a origem unicelular não é a única relatada, ou seja, nem sempre embriões somáticos são originados a partir da divisão assimétrica de uma célula em particular.

Além do mais, os dois tipos de embriões apresentam mudanças morfológicas semelhantes traduzidas nas diferentes fases de desenvolvimento, desde a fase globular à cotiledonar (SHARP *et al.*, 1980; LELJAK-LEVANIĆ; MIHALJEVIC; BAUER, 2015; WINKELMANN, 2016). Em geral, massas proembriogênicas se organizam em um embrião globular típico, que, posteriormente, progride para o estágio cordiforme, caracterizado pela formação dos primórdios cotiledonares. A expansão longitudinal dos cotilédones, hipocótilo e início da radícula marcam o estágio torpedo que antecede o estágio final cotiledonar (LELJAK-LEVANIĆ; MIHALJEVIC; BAUER, 2015), no qual os embriões iniciam o desenvolvimento meristemático e crescimento das plântulas (YANG; ZAHNG, 2010). É importante salientar que, em monocotiledôneas, como as palmeiras, o estágio cordiforme não é observado, em função da presença de um único cotilédone (KAPLAN; COOKE, 1997).

Quando maduros, os embriões zigóticos e somáticos também se assemelham, exibindo polaridades apical-basal e radial, meristemas radicular e caulinar e órgãos embrionários típicos, como radícula, hipocótilo e cotilédones (ZIMMERMAN, 1993; VON ARNOLD *et al.*, 2002; ROCHA *et al.*, 2016), além de apresentarem um sistema vascular independente do tecido materno (GAJ, 2004). Em termos histológicos, ambos embriões também são similares, apresentando os tecidos primários protoderme, meristema fundamental e procâmbio (ROCHA *et al.*, 2016).

Vale salientar que essa correspondência de características reportadas é um indicativo de que as duas embriogêneses apresentam perfis moleculares muito próximos (SU *et al.*, 2009; LELJAK-LEVANIĆ; MIHALJEVIC; BAUER, 2015), como confirmado por Jin *et al.* (2014), ao analisar o transcriptoma de embriões zigóticos e somáticos de algodão. Hand, Vries e Koltunow (2016) ressaltam que essa expressão compartilhada de genes indica que, apesar das duas embriogêneses serem decorrentes de diferentes sinais de ativação e diferentes tecidos, ambos processos convergem para uma

via similar de desenvolvimento. Horstman, Bemer e Boutilier (2017), inclusive, salientam que o ponto de convergência entre as duas embriogêneses constitui um dos maiores questionamentos da biologia vegetal.

Em contrapartida, diferenças óbvias são mencionadas entre os dois sistemas: os zigotos formados pela fusão de gametas são claramente determinados a seguir a rota embriogênica, enquanto células somáticas precisam adquirir competência para responder a sinais específicos e iniciar a embriogênese (PASTERNAK *et al.*, 2002; NAMASIVAYAM, 2007), como resultado da imposição de estímulos químicos e físicos (FEHÉR; PASTERNAK; DUDITS, 2003); presença de marcada polarização nos zigotos (YEUNG, 1995), diferentemente das células embriogênicas *in vitro*; embriões somáticos e zigóticos apresentam diferenças quanto ao tamanho (SUHASINI *et al.*, 1997; JAYASANKAR *et al.*, 2003; MOTOIKE *et al.*, 2007; JIN *et al.*, 2014) e embriões somáticos não requerem dessecação (exceto em *Medicago sativa* e *Picea* spp.) (SMERTENKO; BOZHKOVA, 2014), não apresentam dormência (FEHÉR; PASTERNAK; DUDITS, 2003; KURCZYNSKA *et al.*, 2007; SMERTENKO; BOZHKOVA, 2014; TALAPATRA *et al.*, 2016) e acumulam menos compostos de reserva (SANÉ *et al.*, 2006; WINKELMANN, 2016). Mishra, Sanyal e Amla (2012) consideram ainda, a ausência de endosperma, tegumento e cotilédones verdadeiros em embriões somáticos, as principais diferenças em relação aos embriões zigóticos. Conforme Sghaier *et al.* (2008) e Etienne *et al.* (2013), algumas dessas diferenças podem explicar o menor vigor de mudas provenientes do processo de embriogênese somática em comparação com aquelas oriundas da germinação via sementes.

2.7 Aplicações da embriogênese somática

Em função das similaridades compartilhadas pelas embriogêneses *in vivo* e *in vitro* (ELHITI; STASOLLA; WANG, 2013) e da dificuldade de acesso aos embriões zigóticos que se encontram em pequenas áreas dentro dos óvulos, profundamente embebidos por tecido materno (HOLM *et al.*, 1994; MATTHYS-ROCHON, 2005), a embriogênese somática tem se tornado um modelo dominante para estudos moleculares, citológicos, fisiológicos e de desenvolvimento do processo embriogênico vegetal (QUIROZ-FIGUEROA *et al.*, 2006; KARAMI; SAID, 2010; YANG; ZAHNG, 2010; MAHDAVI-DARVARI; NOOR; ISMANIZAN, 2014; LELJAK-LEVANIĆ; MIHALJEVIC; BAUER, 2015; ELHITI; STASOLLA, 2016). Segundo Karami e Said

(2010), os estudos de embriogênese somática possibilitam o controle e sincronização de todo o processo embriogênico, permitindo a coleta de quantidades suficientes de tecido homogêneo em estádios específicos do processo.

Entretanto, a mais atrativa aplicação da embriogênese somática consiste na possibilidade de propagação massiva de culturas comerciais (VON ARNOLD *et al.*, 2002), especialmente, de várias espécies de palmeiras, dadas as dificuldades de propagação pelos métodos convencionais e a necessidade de propagação clonal de genótipos superiores. A produção massiva de algumas espécies de palmeiras por meio da embriogênese somática já é considerada uma realidade em *P. dactylifera*, como relatado por Abul-Soad e Mahdi (2010), que produziram a partir de um único explante de inflorescência 1.212 plantas enraizadas, em um período de dois anos. Uma produção consideravelmente elevada de embriões somáticos de *C. nucifera*, 98.000 embriões somáticos/explante, foi alcançada em um protocolo desenvolvido por Pérez-Núñez *et al.* (2006), representando, segundo os autores, um progresso importante no sentido de aplicação prática da técnica. Não obstante, a regeneração limitada de plantas de *C. nucifera* provenientes de sistemas *in vitro*, como a embriogênese somática, ainda é considerada um gargalo para grupos de pesquisa no mundo inteiro (NGUYEN *et al.*, 2015; KARUN *et al.*, 2017). A embriogênese somática também tem possibilitado, em função da produção de genótipos geneticamente idênticos, a redução dos ciclos de melhoramento genético de plantas heterozigóticas e de plantas com longos ciclos de vida (HORSTMAN; BEMER; BOUTILIER, 2017).

Mais recentemente, foi relatada uma possibilidade de extensão do uso da técnica de embriogênese somática para culturas onde o processo ainda não é totalmente rentável, mediante a adoção de um novo sistema de produção baseado no enraizamento seriado de miniestacas provenientes de plantas rejuvenescidas obtidas via embriogênese somática. Esse sistema de produção surge como uma alternativa de otimização das taxas de multiplicação, custos de produção e qualidade de mudas de híbridos de *Coffea arabica* (GEORGET *et al.*, 2017).

A técnica ainda se sobressai devido à possibilidade de automatização durante a produção e plantio no campo, pela produção em grande escala de embriões somáticos em biorreatores (MONJA-MIO *et al.*, 2016; FEI; WEATHERS, 2016) e seu encapsulamento para produzir sementes artificiais. Pesquisas visando à produção de sementes sintéticas têm sido noticiadas em *P. dactylifera* (BEKHEET; TAHA; EL-

BAHR, 2005) e em *E. guineensis* (MARIANI *et al.*, 2014; PALANYANDY *et al.*, 2015).

Alguns autores ressaltam a adoção da técnica para propagação de material clonal livre de vírus (ELMEER, 2013; EDWARD; WETTEN, 2016; MEZIANE *et al.*, 2017; SASI; BHAT, 2018). Outra possível aplicação da embriogênese somática consiste na produção de metabólitos secundários (GABR, 1993; VÁZQUEZ-FLOTA; MONFORTE-GONZÁLEZ; MIRANDA-HAM, 2016).

Em adição, como base inicial das engenharia genética e celular, a embriogênese somática assume papel relevante na obtenção de plantas transgênicas (QUIROZ-FIGUEROA *et al.*, 2006; WU *et al.*, 2015; WINKELMANN, 2016), híbridos somáticos, e mutantes (GAJ, 2004), além de se projetar como um modelo de sistema potencial para o estudo da regulação da expressão gênica requerida nos estádios iniciais de desenvolvimento das plantas superiores (ZIMMERMAN, 1993).

A embriogênese somática também subsidia técnicas de preservação de germoplasma, fornecendo material passível de ser criopreservado (VON ARNOLD *et al.*, 2002; KRAJŇÁKOVÁ *et al.*, 2013; BARRA-JIMÉNEZ *et al.*, 2015; WINKELMANN, 2016), especialmente, massas proembriogênicas e embriões somáticos (KULUS, 2016), o que tem sido reportado, inclusive, em palmeiras (KHAWNIUM; TE-CHATO, 2011; SURANTHRAN *et al.*, 2012).

Por outro lado, é importante salientar que a embriogênese somática apresenta algumas limitações inerentes à técnica, a saber: produção assincrônica de embriões (ZEGZOUTI; ARNOULD; FAVRE, 2001; SHAHZAD; SHARMA; SIDDIQUI, 2016), inclusive, relatada em diferentes espécies de palmeiras (LEDO *et al.*, 2002; KARUN *et al.*, 2004; STEINMACHER; CLEMENT; GUERRA, 2007; SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2010; BALZON; LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2013; LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2014; EL BAR; EL DAWAYATI, 2014; PÁDUA *et al.*, 2017); baixa taxa de conversão de plantas, o que limita o número de plantas viáveis produzidas, fato comum em espécies lenhosas (BALLESTER; CORREDOIRA; VIEITEZ, 2016); recalcitrância de algumas espécies vegetais e ocorrência de mutações (variações somaclonais) (SHAHZAD; SHARMA; SIDDIQUI, 2016; HORSTMAN; BEMER; BOUTILIER, 2017) que levam à geração de genótipos imprevisíveis. Vale ressaltar, em contrapartida, que a ocorrência de variações somaclonais pode se configurar como uma fonte promissora de novas e úteis variedades (BHATIA; BERA, 2015).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERLENC-BERTOSSI, F.; CHABRILLANGE, N.; DUVAL, Y.; TREGGAR, J. Contrasting globulin and cysteine proteinase gene expression patterns reveal fundamental developmental differences between zygotic and somatic embryos of oil palm. **Tree Physiology**, v. 28, p. 1157-1167, 2008.

ABUL-SOAD, A. A. Influence of inflorescence explant age and 2,4-D incubation period on somatic embryogenesis of date palm. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 24, n. 5, p. 434-443, 2012.

ABUL-SOAD, A. A. Micropropagation of date palm using inflorescence explants. In: JAIN, S. M.; AL-KHAYRI, J. M.; JOHNSON, D. V. (Eds.). **Date Palm Biotechnology**. Dordrecht: Springer, 2011. p. 91-118.

ABUL-SOAD, A. A.; MAHDI, S. M. Commercial production of tissue culture date palm (*Phoenix dactylifera* L.) by inflorescence technique. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 8, p. 39-44, 2010.

ADKINS, S. W.; SAMOSIR, Y. M.; ERNAWATI, A.; GODWIN, I. D.; DREW, R. A. Control of ethylene and use of polyamines can optimise the conditions for somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.) and papaya (*Carica papaya* L.). **Acta Horticulturae (ISHS)**, v. 461, p. 459-466, 1998.

AGUIAR, J. L. P.; ALMEIDA, S. P. **A Gueroba (*Syagrus oleracea* Becc.) nas Comunidades Rurais II: sistema de produção e avaliação econômica**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2000. 47p.

AGUIAR, J. L. P.; ALMEIDA, S. P.; PEREIRA, G. Avaliação econômica de um sistema de produção de Gueroba (*Syagrus oleracea* Becc.) em Aragoiânia – GO. **Forest** 96, p. 333-334. 1996.

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. La multiplication végétative in vitro du palmier à huile par embryogenèse somatique. **Oléagineux**, v. 36, n. 3, p. 113 - 118, 1981.

AHMADI, B.; SHARIATPANAH, M. E.; OJAGHKANDI, M. A.; HEYDARI, A. A. Improved microspore embryogenesis induction and plantlet regeneration using putrescine, cefotaxime and vancomycin in *Brassica napus* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, n. 3, p. 497-505, 2014.

AL-ALI, A. M.; KO, C.-Y.; AL-SULAIMAN, S. A.; AL-OTAIBI, S. O.; AL-KHAMEES, A. U. H.; AMMAR, M. H. Indirect somatic embryogenesis from mature inflorescence explants of date palm. In: AL-KHAYRI, J. M.; JAIN, S. M.; JOHNSON, D. V. (Eds.). **Date Palm Biotechnology Protocols. Tissue Culture Applications**. New York: Humana Press, 2017. p. 89-97.

ALANG, Z. C.; KRISHNAPILLAY, B. Somatic embryogenesis from young leaf tissue of the Sago palm – *Metroxylon sagu*. **Plant Tissue Culture Letters**, v. 4, n. 1, p. 32-34, 1987.

ALI, A-K. A.; ALI, A-K. S. Effect of different combinations of growth hormones and its interaction on callogenesis. **Research Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 11, p. 83-88, 2015.

AL-KHAYRI, J. M. Basal salt requirements differ according to culture stage and cultivar in date palm somatic embryogenesis. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 32-42, 2011.

AL-KHAYRI, J. M.; IBRAHEEM, Y. *In vitro* selection of abiotic stress tolerant date palm (*Phoenix dactylifera* L.): A review. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 26, n. 11, p. 921-933, 2014.

AL-MAZROUI, H. S.; ZAID, A.; BOUHOUCHE, N. Morphological Abnormalities in Tissue Culture-Derived Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.). **Acta Horticulturae**, v. 736, p. 329-335, 2007.

ALMEIDA, M.; ALMEIDA, C. V. Somatic embryogenesis and in vitro plant regeneration from pejobaye adult plant leaf primordial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n. 41, v. 9, p. 1449-1452, 2006.

ALMEIDA, M.; ALMEIDA, C. V.; GRANER, E. M.; BRONDANI, G. E.; ABREU-TARAZI, M. F. Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study. **Plant Cell Reports**, v. 31, p. 1495-1515, 2012.

ALMEIDA, S. P.; BONNAS, D. S.; JORDÃO, P. R.; AGUIAR, J. L. P. **A Gueroaba (*Syagrus oleracea* Becc.) nas Comunidades Rurais I: aproveitamento agroindustrial**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2000. 37p.

ALTAMURA, M. M.; ROVERE, F. D.; FATTORINI, L.; D'ANGELI, S.; FALASCA, G. Recent advances on genetic and physiological bases of in vitro somatic embryo formation. In: GERMANÀ, M. A.; LAMBARDI, M. (Eds.). **In vitro embryogenesis in higher plants - Methods in molecular biology**. New York: Springer, 2016. p. 47-85.

AMERI, A.; DAVARYNEJAD, G. H.; MOSHTAGHI, N.; TEHRANIFAR, A. Polyethylene glycol and chilling overcome Somatic embryogenesis obstacle in *Pyrus communis*. **Scientia Horticulturae**, v. 227, p. 57-64, 2018.

ASLAM, J.; KHAN, S. A.; CHERUTH, A. J.; MUJIB, A.; SHARMA, M. P.; SRIVASTAVA, P. S. Somatic embryogenesis, scanning electron microscopy, histology and biochemical analysis at different developing stages of embryogenesis in six date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 18, p. 369-380, 2011.

AZPEITIA, A.; CHAN, J. L.; SÁENZ, L.; OROPEZA, C. Effect of 22(S),23(S)-homobrassinolide on somatic embryogenesis in plumule explants of *Cocos nucifera* (L.)

cultured *in vitro*. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 78, n. 5, 591-596, 2003.

BABA, A. I.; NOGUEIRA, F. C. S.; PINHEIRO, C. B.; BRASIL, J. N.; JEREISSATI, E. S.; JUCÁ, T. L.; SOARES, A. A.; SANTOS, M. F.; DOMONT, G. B.; CAMPOS, F. A. P. Proteome analysis of secondary somatic embryogenesis in cassava (*Manihot esculenta*). **Plant Science**, v. 175, p. 717-723, 2008.

BADR, A.; ANGERS, P.; DESJARDINS, Y. Comprehensive analysis of *in vitro* to *ex vitro* transition of tissue cultured potato plantlets grown with or without sucrose using metabolic profiling technique. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, n. 122, p. 491-50, 2015.

BAI, B.; SU, Y. H.; YUAN, J.; ZHANG, X. S. Induction of somatic embryos in *Arabidopsis* requires local YUCCA expression mediated by the down-regulation of ethylene biosynthesis. **Molecular Plant**, v. 6, n. 4, p. 1247-1260, 2013.

BALLESTER, A.; CORREDOIRA, E.; VIEITEZ, A. M. Limitations of somatic embryogenesis in hardwood trees. In: PARK, Y-S.; BONGA, J. M.; MOON, H-K. (Eds). **Vegetative Propagation of Forest Trees**. Korea: National Institute of Forest Science (NIFoS), 2016. p. 56-74.

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.

BANDYOPADHYAY, S.; HAMILL, J. D. Ultrastructural studies of somatic embryos of *Eucalyptus nitens* and comparisons with zygotic embryos found in mature seeds. **Annals of Botany**, v. 86, p. 237-244, 2000.

BARRA-JIMÉNEZ, A.; ARONENB, T. S.; ALEGREA, J.; TORIBIO, M. Cryopreservation of embryogenic tissues from mature holm oak trees. **Cryobiology**, v. 70, n. 3, p. 217-225, 2015.

BATISTA, G. S.; COSTA, R. S.; GIMENES, R.; PIVETTA, K. F. L.; MÔRO, F. V. Aspectos morfológicos dos diásporos e das plântulas de *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc - Arecaceae. **Comunicata Scientiae**, v. 2, n. 3, p. 170-176, 2011a.

BATISTA, G. S.; MAZZINI, R. B.; GIMENES, R.; PRITCHARD, H. W.; PIVETTA, K. F. L. Effects of substrate and mechanical scarification on the germination of *Syagrus oleracea* (Arecaceae) seeds. **Seed Science and Technology**, v. 39, n. 3, p. 649-654, 2011b.

BEKHEET, S. A.; TAHA, H. S.; EL-BAHR, M. K. Preservation of date palm cultures using encapsulated somatic embryos. **Arab Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 319-328, 2005.

BETEKHTIN, A.; ROJEK, M.; MILEWSKA-HENDEL, A.; GAWECKI, R.; KAR CZ, J.; KURCZYNSKA, E.; HASTEROK, R. Spatial distribution of selected chemical cell

wall components in the embryogenic callus of *Brachypodium distachyon*. **PLOS ONE**, v. 11, n. 11, 2016.

BETTENCOURT, G. M. F.; ZANELLA, L. B.; QUOIRIN, M. G. G.; DEGENHARDT-GOLDBACH, J. Efeito da fonte de carbono na embriogênese somática em *Bactris gasipaes*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 36, n. 86, p. 179-183, 2016.

BHASKARAN, S.; SMITH, R. H. Somatic embryogenesis from shoot tip and immature inflorescence of *Phoenix dactylifera* cv. Barhee. **Plant Cell Reports**, v. 12, p. 22-25, 1992.

BHAT, S. V.; BOOTH, S. C.; MCGRATH, S. G. K.; DAHMS, T. E. S. *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae 3841 Adapts to 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid with “Auxin-Like” Morphological Changes, Cell Envelope Remodeling and Upregulation of Central Metabolic Pathways. **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1-21, 2015.

BHATIA, S.; BERA, T. Somatic Embryogenesis and Organogenesis. In: BHATIA, S.; SHARMA, K.; DAHIYA, R.; BERA, T. **Modern applications of plant biotechnology in pharmaceutical sciences**. Amsterdam: Elsevier, 2015. p. 210-230.

BHOJWANI, S. S.; DANTU, P. K. Plant Tissue Culture: An Introductory Text. In: BHOJWANI, S. S.; DANTU, P. K. (Eds.). **Cellular Totipotency**. New Delhi: Springer, 2013. p. 63-74.

BONETTI, K. A. P.; NESI, J.; QUISEN, R. C.; QUOIRIN, M. Somatic embryogenesis from zygotic embryos and thin cell layers (TCLs) of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* × *Elaeis oleifera*). **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 37, p. 2028-2037, 2016.

BONGA, J. M. Can explant choice help resolve recalcitrance problems in in vitro propagation, a problem still acute especially for adult conifers? **Trees**, p. 1-9, 2016.

BORA, P. S.; MOREIRA, R.V. R. Catolé palm (*Syagrus oleracea* Mart) fruits: fatty and amino acids composition. **Grasas y Aceites**, v. 54, n. 2, p. 145-150, 2003.

BORJI, M.; BOUAMAMA-GZARA, B.; CHIBANI, F.; TEYSSIER, C.; AMMAR, A. B.; MLIKI, A.; ZEKRI, S.; GHORBEL, A. Micromorphology, structural and ultrastructural changes during somatic embryogenesis of a Tunisian oat variety (*Avena sativa* L. var ‘Meliane’). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, p. 1-14, 2017.

BOTTI, C.; VASIL, I. K. Ontogeny of somatic embryos of *Pennisetum americanum*. II. In cultured immature inflorescences. **Canadian Journal of Botany**, v. 62, p. 1629-1635, 1984.

BOUFIS, N.; KHELIFI-SLAOUIA, M.; DJILLALIA, Z.; DJAMILA, Z.; MORSLIA, A.; BERNARDSC, M. A.; MAKHZUMC, A.; KHELIFIA, L. Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L. cv. Degla Beida). **Scientia Horticulturae**, v. 172, p. 135-142, 2014.

BOUHOUCHE, N.; AL-MAZROUI, H. S.; ZAID, A. Fertilization failure and abnormal fruit set in tissue culture-derived date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **Acta Horticulturae**, v. 736, p. 329-335, 2007.

BOVI, M. L. A. **Palmito pupunha: informações básicas para cultivo**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1998. 50p. (IAC. Boletim Técnico, 173).

BOVI, M. L. A.; BORTOLETTO, N. Palmito-gariroba: *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc. In: FAHL, J. I.; CAMARGO, M. B. P. de; PIZZINATTO, M. A.; BETTI, J. A.; MELO, A. M. T. de; De MARIA, I. C.; FURLANI, A. M. C. (Ed.). **Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas**. Campinas: IAC, 1998. p. 258-259.

BRANDÃO, M.; LACA-BUENDIA, J. P.; MACEDO, J. F. *Syagrus oleracea* (Mart) Becc. In: BRANDÃO, M.; LACABUENDIA, J. P.; MACEDO, J. F. **Árvores nativas e exóticas do Estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2002. p. 63.

BUFFARD-MOREL, J.; VERDEIL, J.-L.; PANNETIER, C. Embryogenèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) à partir d'explants foliaires: étude histologique. **Canadian Journal of Botany**, v. 70, p. 735-741, 1992.

CARNEIRO, C. E. A.; ROLIM, H. M. V.; FERNANDES, K. F. Estudo das atividades de peroxidases e polifenoloxidase de guariroba (*Syagrus oleracea* Becc) sob a ação de diferentes inibidores. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, v. 25, n. 1, p. 189-193, 2003.

CARVALHO, M. A. F.; PAIVA, R.; ALVES, E.; NOGUEIRA, R. C.; STEIN, V. C.; CASTRO, E. M.; PAIVA, P. D. O.; VARGAS, D. P. Morphogenetic potential of native passion fruit (*Passiflora gibertii* N. E. Brown.) calli. **Brazilian Journal of Botany**, v. 36, p. 141-151, 2013.

CHAN, J. L.; SAÉNZ, L.; TALAVERA, C.; HORNUNG, R.; ROBERT, M.; OROPEZA, C. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 515-521, 1998.

CHEHMALEE, S; TE-CHATO, S. Induction of somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured zygotic embryo of oil palm. **Journal of Agricultural Technology**, v. 4, n. 2, p. 137-146, 2008.

CHENG, W. H.; ZHU, H. G.; TIAN, W.G.; ZHU, S. H.; XIONG, X. P.; SUN, Y. Q.; ZHU, Q. H.; SUN, J. De novo transcriptome analysis reveals insights into dynamic homeostasis regulation of somatic embryogenesis in upland cotton (*G. hirsutum* L.). **Plant Molecular Biology**, v. 92, n. 3, 279-92, 2016.

CHENG, W.-H.; WANG, F.-L.; CHENG, X.-Q.; ZHU, Q.-H.; SUN, Y.-Q.; ZHU, H.-G.; SUN, J. Polyamine and its metabolite H₂O₂ play a key role in the conversion of embryogenic callus into somatic embryos in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 1063, 2015.

CHEONG, Y. H.; CHANG, H. S.; GUPTA, R.; WANG, X.; ZHU, T.; LUAN, S. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen,

abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 129, p. 661-677, 2002.

COIMBRA, M. C.; JORGE, N. Characterization of the Pulp and Kernel Oils from *Syagrus oleracea*, *Syagrus romanzoffiana*, and *Acrocomia aculeata*. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 8, p. 1156-1161, 2011a.

COIMBRA, M. C.; JORGE, N. Fatty acids and bioactive compounds of the pulps and kernels of Brazilian palm species, guariroba (*Syagrus oleracea*), jervá (*Syagrus romanzoffiana*) and macaúba (*Acrocomia aculeata*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 3, p. 679-684, 2012.

COIMBRA, M. C.; JORGE, N. Proximate composition of guariroba (*Syagrus oleracea*), jervá (*Syagrus romanzoffiana*) and macaúba (*Acrocomia aculeata*) palm fruits. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2139-2142, 2011b.

CONSTANTIN, M.; NCHU, W. A.; GODSWILL, N.-N.; WIENDI, N. M. A.; WACHJAR, A.; FRANK, N. E. G. Induction of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Tenera) callogenesis and somatic embryogenesis from young leaf explants. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 4-10, 2015.

CORRÊA, T. R.; MOTOIKE, S. Y.; ANDRADE, A. P. S.; COSER, S. M.; QUEIROZ, V.; GRANJA, M. M. C.; CAETANO, D. D. N.; PEÑA, C. N. M.; PICOLI, E. A. T. Accelerated *in vitro* propagation of elite oil palm genotypes (*Elaeis guineensis* Jacq.) by substituting cytokinin with putrescine. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 50, p. 2767-2775, 2016.

CROUCH, M. L. Non-zygotic embryos of *Brassica napus* L. contain embryo-specific storage proteins. **Planta**, n. 156, p. 520-524, 1982.

CVIKROVÁ, M.; MALÁ, J.; JOSEF, E.; HRUBCOVZÁ, M.; VÁGNER, M. Abscisic acid, polyamines and phenolic acids in sessile oak somatic embryos in relation to their conversion potential. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 36, n. 3, p. 247-255, 1998.

DAVLETOVA, S.; MÉSZÁROS, T.; MISKOLCZI, P.; OBERSCHALL, A.; TÖRÖK, K.; MAGYAR, Z.; DUDITS, D.; DEÁK, M. Auxin and heat shock activation of a novel member of the calmodulin like domain protein kinase gene family in cultured alfalfa cells. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 215-221, 2001.

DE-LA-PEÑA, C.; NIC-CAN, G. I.; GALAZ-ÁVALOS, R. M.; AVILEZ-MONTALVO, R.; LOYOLA-VARGAS, V. M. The role of chromatin modifications in somatic embryogenesis in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 635, 2015.

DIAS, A. C.; GUERRA, M. P.; CORDOBA, A. S.; KEMPER, E. L. Somatic embryogenesis and plant regeneration in the tissue culture of *Geonoma gamiova* (Arecaceae). **Acta Horticulturae**, v. 360, p. 167-172, 1994.

DIAS, J. E. **Cadeia produtiva do óleo de gueroaba (*Syagrus oleracea* Becc.): geração de renda para agricultores familiares e promoção da agrobiodiversidade, Buriti de**

Goiás (GO). 2012. 136p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2012.

DIAS, J. E.; LAUREANO, L. C.; MING, L. C. Cadeia produtiva do óleo de amêndoas de gueroaba (*Syagrus oleracea*): geração de renda para agricultores familiares e promoção da agrobiodiversidade. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 9, n. 1, p. 122-133, 2014.

DINIZ, J. A.; SÁ, L. F. **A cultura da guariroba**. Goiânia: EMATER-GO, 1995. 16 p. (Boletim Técnico, 3).

DODEMAN, V. L.; DUCREUX, G.; KREIS, M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, n. 313, p. 1493-1509, 1997.

DRANSFIELD, J.; UHL, N. W.; ASMUSSEN, C. B.; BAKER, W. J.; HARLEY, M. M.; LEWIS, C. E. **Genera Palmarum: the evolution and classification of palms**. Royal Botanical Garden, Londres: Kew Publishing. 732 p. 2008.

DUBOIS, T. M.; GUEDIRA, J.; DUBOIS, J.; VASSEUR, J. Direct somatic embryogenesis in roots of *Cichorium*: as callose an early marker? **Annals of Botany**, v. 65, p. 539-545, 1990.

DUDITS, D.; BÖGRE, L.; GYÖRGYÉY, J. Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. **Journal of Cell Science**, v. 99, p. 475-484, 1991.

DUDITS, D.; GYÖRGYÉY, J.; BÖGRE, L.; BAKO, L. **Molecular biology of somatic embryogenesis**. In: THORPE, T. A. (Ed.). *In vitro* Embryogenesis in Plants. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 267-308.

EDWARD, R.; WETTEN, A. Virus detection and elimination in Cocoa (*Theobroma Cacao* L.) through somatic embryogenesis. **Journal of Plant Sciences**, v. 4, n. 3, p. 52-57, 2016.

EEUWENS, C. J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants Excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v. 36, p. 23-28, 1976.

EKE, C. R.; AKOMEAH, P.; ASEMOTA, O. Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) from apical meristem tissues from zebiaand loko landraces. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 3, 244-246, 2005.

EL BAR, O. H. A.; EL DAWAYATI, M. M. Histological changes on regeneration *in vitro* culture of date palm (*Phoenix dactylifera*) leaf explants. **Australian Journal of Crop Science**, v. 8, n. 6, p. 848-855, 2014.

ELHITI, M.; STASOLLA, C. Somatic embryogenesis: the molecular network regulating embryo formation. In: MUJIB, A. (Ed.). **Somatic Embryogenesis in Ornamentals and Its Applications**. New Delhi: Springer, 2016. p. 217-229.

- ELHITI, M.; STASOLLA, C.; WANG, A. Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 49, p. 631-642, 2013.
- ELMEER, K. E. S. Factors regulating somatic embryogenesis in plants. In: ASLAM, J.; SRIVASTAVA, P. S.; SHARMA, M. P. (Eds.) **Somatic embryogenesis and gene expression**. New Delhi: Narosa Publishing House, p. 56-81, 2013.
- EMONS, A. M. C. Somatic embryogenesis: cell biological aspects. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 43, n. 1, p.1-14, 1994.
- ENDRESS, V.; BARRIUSO, J.; RUPEREZ, P.; MARTIN, J. P.; BLAZQUEZ, A.; VILLALOBOS, N.; GUERRA, H.; MARTIN, L. Differences in cell wall polysaccharide composition between embryogenic and nonembryogenic calli of *Medicago arborea* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 97, p. 323-329, 2009.
- ESHRAHGI, P.; ZARGHAMI, R.; MIRABDULBAGHI, M. Somatic embryogenesis in two Iranian date palm cultivars. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 1309-1312, 2005.
- ETIENNE, H.; BERTRAND, B.; GEORGET, F.; LARTAUD, M.; MONTES, F.; DECHAMP, E.; VERDEIL, J.-L.; BARRY-ETIENNE, D. Development of coffee somatic and zygotic embryos to plants differs in the morphological, histochemical. **Tree Physiology**, v. 33, p. 640-653, 2013.
- FEHÉR, A. Somatic embryogenesis – stress-induced remodeling of plant cell fate. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1849, n. 4, p. 385-402, 2015.
- FEHÉR, A. Why somatic plant cells start to form embryos? In: MUJIB, S.; SAMAJ, J. (Eds.). **Somatic embryogenesis**. Heidelberg: Plant Cell Monographs, Springer, 2006. p. 85-101.
- FEHÉR, A.; BERNULA, D.; GÉMES, K. The Many Ways of Somatic Embryo Initiation. In: LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. (Eds.). **Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications**. Springer: Switzerland, 2016. p. 23-37.
- FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, p. 201-228, 2003.
- FEI, L.; WEATHERS, P. Bioreactors for Plant Embryogenesis and Beyond. In: GERMANÀ, M. A.; LAMBARDI, M. (Eds.). **In vitro embryogenesis in higher plants - Methods in molecular biology**. New York: Springer, 2016. p. 245 - 259.
- FERNANDO, S. C.; VERDEIL, J. L.; HOCHER, V.; WEERAKOON, L. K.; HIRIMBUREGAMA, K. Histological analysis of plant regeneration from plumule explants of *Cocos nucifera*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 72, n. 3, p. 281-284, 2003.

FERRY, M. Potential of date palm micropropagation for improving small farming systems. In: JAIN, S. M.; AL-KHAYRI, J. M.; JOHNSON, D. V. (Eds.). **Date Palm Biotechnology**. Dordrecht: Springer, 2011. p. 15-28.

FKI, L.; BOUAZIZ, N.; KRIAA, W.; BENJEMAA-MASMOUDI, R.; GARGOURI-BOUZID, R.; RIVAL, A.; DRIRA, N. Multiple bud cultures of 'Barhee' date palm (*Phoenix dactylifera*) and physiological status of regenerated plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, p. 1694-1700, 2011a.

FKI, L.; MASMOUDI, R.; DRIRA, N.; RIVAL, A. An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L., cv. Deglet Nour. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 517-524, 2003.

FKI, L.; MASMOUDI, R.; KRIAÂ, W.; MAHJOUB, A.; SGHAIER, B.; MZID, R.; MLIKI, A.; RIVAL, A.; DRIRA, N. Date Palm Micropropagation via Somatic Embryogenesis. In: JAIN, S. M.; AL-KHAYRI, J. M.; JOHNSON, D. V. (Eds.). **Date Palm Biotechnology**. Dordrecht: Springer, 2011b. p. 47-68.

FOBERT, P. A.; WEBB, D. T. Effects of polyamines, polyamine precursors, and polyamine biosynthetic inhibitors on somatic embryogenesis from eggplant (*Solanum melongena*) cotyledons. **Canadian Journal of Botany**, v. 66, n. 9, p. 1734-1742, 1988.

FONSECA, R.; RODRIGUES, R. Análise estrutural e aspectos do mosaico sucessional de uma floresta semidecídua em Botucatu, SP. **Scientia Forestalis**, v. 57, p. 27-43, 2000.

FRAGA, H. P. F.; VIEIRA, L. N.; HERINGER, S. A.; PUTTKAMMER, C. C.; SILVEIRA, V.; GUERRA, M. P. DNA methylation and proteome profiles of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze embryogenic cultures as affected by plant growth regulators supplementation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 125, n. 2, p. 353-374, 2016a.

FRAGA, H. P. F.; VIEIRA, L. N.; PUTTKAMMERA, C. C.; SANTOS, H. P.; GARIGHAN, J. A.; GUERRA, M. P. Glutathione and abscisic acid supplementation influences somatic embryo maturation and hormone endogenous levels during somatic embryogenesis in *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex Endl. **Plant Science**, v. 253, p. 98-106, 2016b.

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.

GABR, M. F. *In vitro* production of jojoba liquid wax from somatic embryos proliferated via vegetative tissues. **Egyptian Journal of Horticulture**, v. 20, p. 135-44. 1993.

GABR, M. F.; TISSERAT, B. Propagating palms *in vitro* with special emphasis on the date palm (*Phoenix dactylifera*). **Scientia Horticulturae**, v. 25, p. 255-262, 1985.

GAJ, M. D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation**, v. 43, p. 27-47, 2004.

GALLO-MEAGHER, M; GREEN, J. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of saw palmetto, an important landscape and medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 68, p. 253-256, 2002.

GANDOLFI, S.; LEITÃO FILHO, H.; BEZERRA, C. L. F. Levantamento florístico caráter sucessional das espécies arbustivo-arbóreas de uma floresta mesófila semidecídua no município de Guarulhos - SP. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 55, n. 4, p. 753-767, 1995.

GARCIA, A. H.; VIEIRA, J. R.; COSTA, M. G. G. Contribuição ao conhecimento da biologia do *Pachymerus nucleorum* Fabr., 1792 (Bruchidae-Coleoptera) em *Syagrus oleracea* Mart. (Palmae). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 9, n. 1, 1979.

GARCIA; ROSA, J. A. M.; COSTA, M. G. G. Contribuição ao conhecimento do ataque do *Pachymerus nucleorum* Fabr., 1792 (Bruchidae-Coleoptera) em *Syagrus oleracea* Mart. (Palmae). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 10, n. 1, 1980.

GARROCHO-VILLEGAS, V.; AGUILAR, R.; JIMÉNEZ, E. S. Contribution of the *Zea mays* insulin-like growth factor (ZmIGF) to the embryogenic competence of maize tissue cultures. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 53, n. 2, p. 122-132, 2017.

GEORGET, F.; COURTEL, P.; GARCIA, E. M.; HIDALGO, M.; ALPIZAR, E.; BREITLER, J-C.; BERTRANDA, B.; ETIENNEA, H. Somatic embryogenesis-derived coffee plantlets can be efficiently propagated by horticultural rooted mini-cuttings: A boost for somatic embryogenesis. **Scientia Horticulturae**, v. 216, p. 177-185, 2017.

GLIWICKA, M.; NOWAK, K.; BALAZADEH, S.; MUELLER-ROEBER, B.; GAJ, M. D. Extensive modulation of the transcription factor transcriptome during somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. **PLOS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1-20, 2013.

GOH, D. K. S.; BON, 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, p. 375-381, 2001.

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, p. 424-427, 1999.

GOMES, H. T.; BARTOS, P. M. C.; BALZON, T. A.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Regeneration of somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis*) using temporary immersion bioreactors. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 244-249, 2016.

GOMES, H. T.; BARTOS, P. M. C.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Optimizing rooting and survival of oil palm (*Elaeis guineensis*) plantlets derived from somatic

embryos. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 51, p. 111-117, 2015.

GRAFI, G.; BARAK, S. Stress induces cell dedifferentiation in plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1849, p. 378-384, 2015.

GRAFI, G.; FLORENTIN, A.; RANSBOTYN, V.; MORGENSTERN, Y. The stem cell state in plant development and in response to stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 2, p. 1-9, 2011.

GUAN, Y.; LI, S.-G.; FAN, X.-F.; SU, Z.-H. Application of somatic embryogenesis in woody plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 938, p. 1-12, 2016.

GUEDES, R S.; SILVA, T. L.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. N. Initial requirements for embryogenic calluses initiation in thin cell layers explants from immature female oil palm inflorescences. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 52, p. 10774-10780, 2011.

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

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

GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis in tissue cultures of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). In: AHUJA, M. R. (Ed.). **Woody Plant Biotechnology**. New York: Plenwn Press, 1991. p. 189-196.

GUTIÉRREZ-MORA, A.; GONZÁLEZ-GUTIÉRREZ, A.G.; RODRÍGUEZ-GARAY, B.; ASCENCIO-CABRAL, A.; LI-WEI, L. Plant somatic embryogenesis: some useful considerations. In: SATO, K. I. (Ed.). **Embryogenesis**. Rijeka: InTech, 2012. p. 229-241.

GUZZO, F.; BALDAN, B.; MARIANI, P.; LO SCHIAVO, F.; TERZI, M. Studies on the origin of totipotent cells in explants of *Daucus carota* L. **Journal of Experimental Botany**, v. 45, n. 279, p. 1427-1432, 1994.

HABERLANDT, G. Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. In: LAIMER, M.; RÜCKER, W. (Eds.). **Plant Tissue Culture. 100 years since Gottlieb Haberlandt**. Viena: Springer-Verlag Wien. p. 1-24.

HALPERIN, W. Alternative morphogenetic events in cell suspensions. **American Journal of Botany**, v. 53, n. 5, p. 443-453, 1966.

HALPERIN, W.; JENSEN, W. A. Ultrastructural changes during growth and embryogenesis in carrot cell cultures. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 18, p. 428-443, 1967.

HAND, M. L.; VRIES, S.; KOLTUNOW, A. M. G. A comparison of in vitro and in vivo asexual embryogenesis. In: GERMANÀ, M. A.; LAMBARDI, M. (Eds.). **In vitro embryogenesis in higher plants - Methods in molecular biology**. New York: Springer, 2016. p. 3-24.

HARADA, J. J.; BELMONTE, M. F.; KWONG, R. W. Plant Embryogenesis (Zygotic and Somatic). **Encyclopedia of Life Sciences**, p. 1-10, 2010.

HE, X.-J.; CHEN, T.; ZHU, J.-K. Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. **Cell Research**, v. 21, n. 3, p. 442-465.

HEGAZY, A. E.; ABOSHAMA, H. M. An efficient novel pathway discovered in date palm micropropagation. **Acta Horticulturae**, v. 882, p. 167-176, 2010.

HENDERSON, A.; GALEANO, G.; BERNAL, R. **Field Guide to the Palms of the Americas**. New Jersey: Princeton University, 1995. 352 p.

HENDERSON, F. Morphology and anatomy of palm seedlings. **The Botanical Review**, v.72, n. 4, 273-329, 2006.

HERRERA, J. C.; CORTINA, H. A.; ANTHONY, F.; PRAKASH, N. S.; LASHERMES, P.; GAITÁN, A. L.; CRISTANCHO, M. A.; ACUÑA, R.; LIMA, D. R. Coffee (*Coffea* spp.). In: SINGH, R. J. (Ed.). **Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement Series – Medicinal Plants**. Boca Raton: CRC Press. 2011. p. 589-640.

HIANE, P. A.; SILVA, V. C. F.; RAMOS FILHO, M. M.; RAMOS, M. I. L.; CAMPOS, R. P. Caracterização química do palmito guariroba *in natura* e congelado. **Ciência Rural**, v. 41, n. 6, p.1082-1087, 2011.

HOLM, P. B.; KNUDSEN, S.; MOURITZEN, P.; NEGRI, D.; OLSEN, F. L.; ROUE, C. Regeneration of fertile barley plants from mechanically isolated protoplasts of the fertilized egg cell. **Plant Cell**, v. 6, n. 4, p. 531-543, 1994.

HORSTMAN, A.; BEMER, M.; BOUTILIER, K. A transcriptional view on somatic embryogenesis. **Wiley Regeneration**, v. 4, n. 4, p. 201-216, 2017.

IBRAHEEM, Y. M.; PINKER, I.; BÖHME, M. The effect of sodium chloride-stress on 'Zaghloul' date palm somatic embryogenesis. **Acta Horticulturae**, v. 961, p. 367-373. 2012.

IBRAHIM, M. S. D.; HARTATI, R. S.; RUBIYO; PURWITO, A.; SUDARSONO. Direct and indirect somatic embryogenesis on Arabica Coffee (*Coffea arabica*). **Indonesian Journal of Agricultural Science**, v. 14, n. 2, p. 79-86, 2013.

IKEUCHI, M.; SUGIMOTO, K.; IWASE, A. Plant callus: mechanisms of induction and repression. **Plant Cell**, v. 25, n. 9, p. 3159-73, 2013.

ISAH, T. Induction of somatic embryogenesis in woody plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 118, p. 1-22, 2016.

IWASE, A.; MITSUDA, N.; KOYAMA, T.; HIRATSU, K.; KOJIMA, M.; ARAI, T.; INOUE, Y.; SEKI, M.; SAKAKIBARA, H.; SUGIMOTO, K.; OHME-TAKAGI, M. The AP2/ERF Transcription Factor WIND1 Controls Cell Dedifferentiation in *Arabidopsis*. **Current Biology**, v. 21, p. 508-514, 2011.

JALIGOT, E.; BEULÉ, T.; RIVAL, A. Methylation-sensitive RFLPs: characterisation of two oil palm markers showing somaclonal variation-associated polymorphism. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, p. 1263-1269, 2002.

JALIGOT, E.; RIVAL, A.; BEULÉ, T.; DUSSERT, S.; VERDEIL, J. L. Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): the DNA methylation hypothesis. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 684-690, 2000.

JATOI, M. A.; ABUL-SOAD, A. A.; MARKHAND, G. S.; SOLANGI, N. Establishment of an efficient protocol for micropropagation of some Pakistani cultivars of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) using novel inflorescence explants. **Pakistan Journal of Botany**, v. 47, n. 5, p. 1921-1927, 2015.

JAYANTHI, M.; MOHAN, N. M.; MANDAL, P. K. Direct somatic embryogenesis and plantlet regeneration in oil palm. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 20, p. 249-251, 2011.

JAYANTHI, M.; SUSANTHI, B.; NANDIGANTI, M. M.; MANDAL, P. K. *In vitro* somatic embryogenesis and plantlet regeneration from immature male inflorescence of adult dura and tenera palms of *Elaeis guineensis* (Jacq.). **SpringerPlus**, v. 4, n. 256, p. 1-7, 2015.

JAYARAJ, K. L.; BHAVYASHREE, U.; FAYAS, T. P.; SAJINI, K. K.; RAJESH, M.K.; KARUN, A. Histological studies of cellular differentiation during somatic embryogenesis of coconut plumule-derived calli. **Journal of Plantation Crops**, v. 43, n. 3, p. 196-203, 2015.

JAYASANKAR, S.; BONDADA, B. R.; LI, Z.; GRAY, D. J. Comparative anatomy and morphology of *Vitis vinifera* (Vitaceae) somatic embryos from solid- and liquid-culture-derived proembryogenic masses. **American Journal of Botany**, v. 90, p. 973-979, 2003.

JIANG, F.; FENG, Z.; LIU, H.; ZHU, J. Involvement of plant stem cells or stem cell-like cells in dedifferentiation. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 1028, p. 1-6, 2015.

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

JIMÉNEZ, V. M. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 2, p. 196-223, 2001.

JIN, F. Y.; HU, L. S.; YUAN, D. J.; XU, J.; GAO, W. H.; HE, L. R.; YANG, X. Y.; ZHANG, X. L. Comparative transcriptome analysis between somatic embryos (SEs)

and zygotic embryos in cotton: evidence for stress response functions in SE development. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, p. 161-173, 2014.

JOHNSON, D.V. **Non-wood forest products 10: Tropical palms**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 1998. 172 p. Disponível em <<http://www.fao.org/docrep/x0451e/x0451e00.HTM>>. Acesso: 06 nov. 2015.

KACKAR, A.; SHEKHAWAT, N. S. Plant regeneration through somatic embryogenesis and polyamine levels in cultures of grasses of Thar Desert. **Journal of Cell and Molecular Biology**, v. 6, n. 2, p. 121-127, 2007.

KAMADA, H.; TACHIKAWA, Y.; SAITOU, T.; HARADA, H. Heat stresses induction of carrot somatic embryogenesis. **Plant Tissue Culture Letters**, v. 11, p. 229-232, 1994.

KANCHANAPOOM, K.; DOMYOAS, P. The origin and development of embryoids in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) embryo culture. **Science Asia**, v. 25, p. 195-202, 1999.

KAPLAN, D. R.; COOKE, T. J. Fundamental concepts in the embryogenesis of dicotyledons: a morphological interpretation of embryo mutants. **The Plant Cell**, v. 9, p. 1903-1919, 1997.

KARAMI, O.; DELJOU, A.; ESNA-ASHARI, M.; OSTAD-AHMADI, P. Effect of sucrose concentrations on somatic embryogenesis in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 110, p. 340-344, 2006.

KARAMI, O.; SAID, A. The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. **Molecular Biology Reports**, v. 37, p. 2493-2507, 2010.

KÄRKÖNEN, A. Anatomical study of zygotic and somatic embryos of *Tilia cordata*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 61, p. 205-214, 2000.

KARUN, A.; RAJESH, M. K.; SAJINI, K. K.; MURALIKRISHNA, K. S.; MEEMA, M.; SHAREEFA, M.; THOMAS, R. J. Coconut tissue culture: The indian initiatives, Experiences and Achievements. **Cord**, v. 33, n. 2, p. 14-24, 2017.

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, p. 1623-1628, 2004.

KARUNARATNE, S.; PERIYAPPERUMA, K. Culture of immature embryos of coconut, *Cocos nucifera* L.: callus proliferation and somatic embryogenesis. **Plant Science**, v. 62, p. 247-253, 1989.

KAWAHARA, R.; KOMAMINE, A. Molecular basis of somatic embryogenesis. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry: Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed**. Berlin: Springer – Verlag, 1995. p. 30-40.

KEVERS, C.; GAL, N. L.; MONTEIRO, M.; DOMMES, J.; GASPAR, T. Somatic embryogenesis of *Panax ginseng* in liquid cultures: a role for polyamines and their metabolic pathways. *Plant Growth Regulation*, v. 31, p. 209-214, 2000.

KHAWNIUM, T.; TE-CHATO, S. Simple vitrification protocol for cryopreservation of oil palm using embryogenic culture. *Journal of Agriculture Technology*, v. 7, p. 519-529, 2011.

KIKUCHI, A.; SANUKI, N.; HIGASHI, K.; KOSHIBA, T.; KAMADA, H. Abscisic acid and stress treatment are essential for the acquisition of embryogenic competence by carrot somatic cells. *Planta*, v. 223, p. 637-645, 2006.

KRAJŇÁKOVÁ, J.; BERTOLINI, A.; GÖMÖRY, D.; VIANELLO, A.; HÄGGMAN, H. Initiation, long-term cryopreservation, and recovery of *Abies alba* Mill. embryogenic cell lines. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, v. 49, p. 560-571, 2013.

KRIAA, W.; SGHAIER, B.; MASMOUDI, F.; BENJEMAA, R.; DRIRA, N. The date palm (*Phoenix dactylifera* L.) micropropagation using completely mature female flowers. *Comptes Rendus Biologies*, v. 335, p. 194-204, 2012.

KRIKORIAN, A. D.; SIMOLA, L. K. Totipotency, somatic embryogenesis, and Harry Wais (1893-1973). *Physiologia Plantarum*, v. 105, p. 348-355, 1999.

KRISHNAN, S. R. S.; SIRIL, E. A. Auxin and nutritional stress coupled somatic embryogenesis in *Oldenlandia umbellata* L. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, v. 23, n. 2, p. 471-475, 2017.

KULUS, D. Application of cryogenic technologies and somatic embryogenesis in the storage and protection of valuable genetic resources of ornamental plants. In: MUJIB, A. (Ed.). *Somatic Embryogenesis in Ornamentals and Its Applications*. New Delhi: Springer, 2016. p. 1-26.

KUMAR, V.; VAN STADEN, J. New insights into plant somatic embryogenesis: an epigenetic view. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 39, n. 194, 1-17, 2017.

KURCZYNSKA, E. U.; GAJ, M. D.; UJCZAK, A.; MAZUR, E. Histological analysis of direct somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta*, v. 226, p. 619-628, 2007.

KURCZYNSKA, E. U.; POTOCKA, I.; DOBROWOLSKA, I.; KULINSKA-LUKASZEK, K.; SALA, K.; WROBEL, J. Cellular markers for somatic embryogenesis. In: SATO, K. I. (Ed.). *Embryogenesis*. InTech, 2012, p. 307-332.

KURUP, S. S.; ALY, M. A. M.; LEKSHMI, G.; TAWFIK, N. H. Rapid *in vitro* regeneration of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Kheneizi using tender leaf explant. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, v. 26, n. 6, p. 539-544, 2014.

- LEDO, A. S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K.; de 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, p. 601-603, 2002.
- LELJAK-LEVANIĆ, D.; MIHALJEVIC, S.; BAUER, N. Somatic and zygotic embryos share common developmental features at the onset of plant embryogenesis. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, n. 127, p. 1-14, 2015.
- LITZ, R. E.; SCHAFFER, B. Polyamines in adventitious and somatic embryogenesis in mango (*Mangifera indica* L.). **Journal of Plant Physiology**, v. 128, p. 251-258, 1987.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 368 p.
- LORENZI, H.; NOBLICK, L. R.; KAHN, F.; FERREIRA, E. **Flora brasileira – Arecaceae (palmeiras)**. Nova Odessa: Plantarum, 2010. 384 p.
- LORENZI, H.; SOUZA, H. M.; MEDEIROS-COSTA, J. T.; CERQUEIRA, L. S. C.; BEHR, N. **Palmeiras no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Plantarum, 1996. 303 p.
- LORENZI, H.; SOUZA, H.M.; COSTA, J.T.M.; CERQUEIRA, L.S.C.; FERREIRA, E. **Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Plantarum, 2004. 432 p.
- LOYOLA-VARGAS, V. M. The History of Somatic Embryogenesis. In: LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. (Eds.). **Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications**. Springer: Switzerland, 2016. p. 11-22.
- LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. Somatic Embryogenesis. An Overview. In: LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. (Eds.). **Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications**. Springer: Switzerland, 2016. p. 1-8.
- LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. An improved protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from mature zygotic embryos. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 118, p. 485-496, 2014.
- LUNA, J. R. H.; SÁNCHEZ HINOJOSA, V. M.; IDROVO, N. A. S.; BUSTAMANTE, J. F. G. Estudios histológicos del proceso de embriogénesis somática en palma Coco Cumbé (*Parajubaea cocoides* Burret) a partir de embriones cigóticos inmaduros. **Cultivos Tropicales**, v. 38, n. 2, p. 36-44, 2017.
- MAGNANI, E.; JIMÉNEZ-GÓMEZ, J. M.; SOUBIGOU-TACONNAT, L.; LEPINIEC, L.; FIUME, E. Profiling the onset of somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. **BMC Genomics**, v. 18, n. 998, 2017.
- MAHDAVI-DARVARI, F.; NOOR, N. M.; ISMANIZAN, I. Epigenetic regulation and gene markers as signals of early somatic embryogenesis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 120, n. 2, p. 407-422, 2014.

MALINOWSKI, R.; FILIPECKI, M. The role of cell wall in plant embryogenesis. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 7, p. 1137-1151, 2002.

MARBUN, C. L. M.; TORUAN-MATHIUS, N.; REFLINI; UTOMO, C.; LIWANG, T. Micropropagation of embryogenic callus of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) using temporary immersion system. **Procedia Chemistry**, v. 14, p. 122-129, 2015.

MARIANI, T. S.; SASMITAMIHARJA, D.; MIENANTI, D.; LATIF, S.; GINTING, G.; MIYAKE, H. Somatic embryogenesis of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) for synthetic seed production. **Asian Journal of Applied Sciences**, v. 2, n. 3, p. 358-367, 2014.

MARUYAMA, T. E.; HOSOI, Y. Somatic Embryogenesis in Japanese Black Pine (*Pinus thunbergii* Parl.). In: MUJIB, A. (Ed.). **Somatic Embryogenesis in Ornamentals and Its Applications**. New Delhi: Springer, 2016. p. 27-40.

MATTHYS-ROCHON, E. Secreted molecules and their role in embryo formation in plants: a mini-review. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, v. 47, n. 1, p. 23-29, 2005.

MAZRI, M. A.; BELKOURA, I.; MEZIANI, R.; MOKHLESS, B.; NOUR, S. Somatic embryogenesis from bud and leaf explants of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Najda. **3 Biotech**, v. 7, n. 58, p. 1-9, 2017.

MAZRI, M. A.; BELKOURA, I.; PLIEGO-ALFARO, F.; BELKOURA, M. Somatic embryogenesis from leaf and petiole explants of the Moroccan olive cultivar Dahbia. **Scientia Horticulturae**, v. 159, p. 88-95, 2013.

MELO, B. de. **Cultivo de embrião in vitro da Guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.)]**. 2000. 117p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

MELO, B.; PINTO, J. E. B. P.; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, F. C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões de guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc]. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, p. 1301-1306, 2001.

MELO, J. T. **Cultivo de Guariroba (*Syagrus oleracea* Becc.) em Sistemas Consorciados com Espécies Florestais no Cerrado**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003. 2 p. Comunicado Técnico 97.

MERKLE, S. A.; PARROTT, W. A.; FLINN, B. S. Morphogenic aspects of somatic. In: THORPE, T. A. (Ed.). **In vitro embryogenesis in plant**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 155-203.

MEZIANE, M.; FRASHERI, D.; CARRA, A.; BOUDJENIBA, M.; D'ONGHIA, A. M.; MERCATI, F.; DJELOUAH, K; CARIMI, F. Attempts to eradicate graft-transmissible infections through somatic embryogenesis in *Citrus* ssp. and analysis of

genetic stability of regenerated plants. **European Journal of Plant Pathology**, v. 148, n. 1, p. 85-95, 2017.

MIHALJEVIC, S.; RADIC, S.; BAUER, N.; GARIC, R.; MIHALJEVIC, B.; HORVAT, G.; LELJAK-LEVANIC, D.; JELASKA, S. Ammonium-related metabolic changes affect somatic embryogenesis in pumpkin (*Cucurbita pepo* L.). **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 16, p. 1943-1951, 2011.

MISHRA, S.; SANYAL, I.; AMLA, D.V. Changes in protein pattern during different developmental stages of somatic embryos in chickpea. **Biologia Plantarum**, v. 56, n. 4, p. 613-619, 2012.

MONJA-MIO, K. M.; HERRERA-ALAMILLO, M. A.; ROBERT, M. L. Somatic Embryogenesis in Temporary Immersion Bioreactors. In: LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. (Eds.). **Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications**. Springer: Switzerland, 2016. p. 435-454.

MOON, H.-K.; LEE, H.; PAEK, K.-Y.; PARK, S.-Y. Osmotic stress and strong 2,4-D shock stimulate somatic-to-embryogenic transition in *Kalopanax septemlobus* (Thunb.) Koidz. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, n. 1710, 2015.

MORAES, B. L. C. de; SOUTO, A. S.; SCHIEL, N. Adaptability in stone tool use by wild capuchin monkeys (*Sapajus libidinosus*). **American Journal of Primatology**, v. 76, p. 967-977, 2014.

MOTOIKE, S. Y.; SARAIVA, E. A.; VENTRELLA, M. C.; SILVA, C. V.; SALOMÃO, L. C. C. Somatic embryogenesis of *Myrciaria aureana* (Brazilian grape tree). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 89, p. 75-81, 2007.

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

MOURA, E. F.; VENTRELLA, M. C.; MOTOIKE, S. Y. Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). **Scientia Agricola**, v. 67, p. 399-407, 2010.

MOZGOVÁ, I.; MUÑOZ-VIANA, R.; HENNING, L. PRC2 Represses Hormone-Induced Somatic Embryogenesis in Vegetative Tissue of *Arabidopsis thaliana*. **PLOS Genetics**, v. 13, n. 1, p. 1- 27, 2017.

MUILU-MÄKELÄ, R.; VUOSKU, J.; HAMBERG, L.; LATVA-MÄENPÄÄ, H.; HÄGGMAN, H.; SARJALA, T. Osmotic stress affects polyamine homeostasis and phenolic content in proembryogenic liquid cell cultures of Scots pine. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 122, p. 709-726, 2015.

MUNISWAMY, B.; SREENATH, H. L. Effect of kanamycin on callus induction and somatic embryogenesis in cultured leaf tissues on *Coffea canephora* Pierre (Robusta). **Journal Coffee Research**, v. 26, n. 1, p. 44-51, 1996.

MUNKSGAARD, D.; MATTSSON, O.; OKKLES, F. T. Somatic embryo development in carrot is associated with an increase in levels of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine and DNA methylation. **Physiologia Plantarum**, v. 93, n. 5-10, 1995.

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

NA, H.; KIM, K. W.; KWACK, Y.; KIM, S. K.; CHUN, C. Comparative anatomy of embryogenic and non-embryogenic calli from *Pimpinella brachycarpa*. **Journal of Plant Biology**, v. 50, n. 3, p. 344-350, 2007.

NAIK, P. M.; AL-KHAYRI, J. M. Somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) through cell suspension culture. In: JAIN, S. M. (Ed.). **Protocols for in vitro cultures and secondary metabolite analysis of aromatic and medicinal plants - Methods in Molecular Biology**. New York: Springer, 2016. p. 357-366.

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

NASCENTE, A. S. Caracterização morfológica de progênies nativas de Guariroba (*Syagrus oleracea* Becc.) no Estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 33, n. 2, p. 113-115, 2003.

NASCENTE, A. S.; PEIXOTO, N. Levantamento de dados sobre guariroba no Estado de Goiás. **Horticultura Brasileira**, v.18, p. 878-79, 2000. Suplemento.

NASCENTE, A. S.; PEIXOTO, N.; SANTOS, C. W. F. Peso de sementes e emergência de plântulas de guariroba (*Syagrus oleracea* Becc.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 30, n. 2, p.77-79, 2000.

NASCIMENTO, W. M. O.; OLIVEIRA, M. S. P. **Produção de Mudanças de Tucumanzeiro-do-pará (*Astrocaryum vulgare* Mart.) por Perfilhos**. Belém: Embrapa, 2011. 5 p. Comunicado Técnico, 230.

NASCIMENTO-GAVIOLI, M. C. A.; CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; STEINMACHER, D.; REE, J. F.; STEINER, N.; GUERRA, M. P. Physiological and biochemical features of embryogenic and non-embryogenic peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) cultures. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, p. 1-8, 2017.

NETO, R. A.; OLIVEIRA, J. C. de; FREITAS, B. M. S. de; LIMA, L. R. de; SOUZA, J. L. F. de; SALES, J. de F. Desiccation tolerance of embryos of *Syagrus oleracea*, a cerrado native bitter palm heart. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 11, 922-929, 2015.

NEUMANN, K. H. **Some studies on somatic embryogenesis: a tool in plant biotechnology**. India: Palestra - 87th Indian Science Congress. 2000. Disponível em: <<http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2000/321/>>. Acesso em: 11 nov. 2016.

NEUMANN, K.; KUMAR, A.; IMANI, J. Plant Propagation - Meristem Cultures, Somatic Embryogenesis. In: NEUMANN, K.; KUMAR, A.; IMANI, J. **Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology: Basics and Application**. Berlin: Springer, 2009. p. 75-137.

NGUYEN, Q. T.; BANDUPRIYA, H. D. D.; LOPEZ-VILLALOBOS, A.; SISUNANDAR, S.; FOALE, M.; ADKINS, S. W. Tissue culture and associated biotechnological interventions for the improvement of coconut (*Cocos nucifera* L.): a review. **Planta**, v. 242, p. 1059-1076, 2015.

NIC-CAN, G. I.; AVILEZ-MONTALVO, J. R.; AVILES-MONTALVO, R. N.; MÁRQUEZ-LÓPEZ, R. E.; MELLADO-MOJICA, E.; GALAZ-ÁVALOS, R. M.; LOYOLA-VARGAS, V. M. The relationship between stress and somatic embryogenesis. In: LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. (Eds.). **Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications**. Springer: Switzerland, 2016. p. 151-170.

NIC-CAN, G. I.; GALAZ-ÁVALOS, R. M.; DE-LA-PEÑA, C.; ALCAZAR-MAGAÑA, A.; WROBEL, K.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Somatic embryogenesis: identified factors that lead to embryogenic repression. A case of species of the same genus. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1-21, 2015.

NIC-CAN, G. I.; LOYOLA-VARGAS, V. M. The role of the auxins during somatic embryogenesis. In: LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. (Eds.). **Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications**. Springer: Switzerland, 2016. p. 171-182.

NOBLICK, L. R. A revision of the genus *Syagrus* (Arecaceae). **Phytotaxa**, v. 294, n. 1, p. 1-262, 2017.

NOWAK, K.; GAJ, M. D. Stress-related function of bHLH109 in somatic embryo induction in *Arabidopsis*. **Journal of Plant Physiology**, v. 193, p. 119-126, 2016.

NOZAKI, V. T.; MUNHOZ, C. L.; GUIMARÃES, R. C. A.; HIANE, P. A.; ANDREU, M. P.; VIANA, L. H.; MACEDO, M. L. R. Perfil lipídico da polpa e amêndoa da guarirova. **Ciência Rural**, v. 42, n. 8, p. 1518-1523, 2012.

NUNES, H. F. **Estudo fenológico e morfológico da palmeira guarirova (*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.)**. 2010. 69p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Goiás, Campus Jataí, Jataí, 2010.

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. Morpho-histological, histochemical, and molecular evidences related to cellular reprogramming during somatic embryogenesis of the model grass *Brachypodium distachyon*. **Protoplasma**, p. 1-18, 2017.

OLIVEIRA, E. R.; MONÇÃO, F. P.; GABRIEL, A. M. A.; SANTOS, R. A.; MOURA, L. V.; SANTOS, M. V.; SILVA, L. V. M. Valor nutricional dos resíduos industriais da

guariroba (*Syagrus oleracea*) para ruminantes. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 10, n. 2, p. 334-339, 2015.

ONG-ABDULLAH, M.; ORDWAY, J. M.; JIANG, N.; OOI, S.-E.; KOK, S.-Y.; SARPAN, N.; AZIMI, N.; HASHIM, A. T. H.; ISHAK, Z.; ROSLI, S. K.; MALIKE, F. A.; BAKAR, N. A. B.; MARJUNI, M.; ABDULLAH, N.; YAAKUB, Z.; AMIRUDDIN, M. D.; NOOKIAH, R.; SINGH, R.; LOW, E.-T. L.; CHAN, K.-L.; AZIZI, N.; SMITH, S. H.; BACHER, B.; BUDIMAN, M. A.; BRUNT, A. V.; WISCHMEYER, C.; BEIL, M.; HOGAN, M.; LAKEY, N.; LIM, C.-C.; ARULANDOO, X.; WONG, C.-K.; CHOO, C.-N.; WONG, W.-C.; KWAN, Y.-Y.; ALWEE, S. S. R. S.; SAMBANTHAMURTHI, R.; MARTIENSSEN, R. A. Loss of Karma transposon methylation underlies the mantled somaclonal variant of oil palm. **Nature**, v. 525, p. 533-537, 2015.

OOI, S.-E.; CHOO, C.-N.; ISHAK, Z.; ONG-ABDULLAH, M. A candidate auxin-responsive expression marker gene, EgIAA9, for somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 110, p. 201-212, 2012.

OTHMANI, A. C.; BAYOUDH, C.; DRIRA, N.; MARRAKCHI, M.; TRIFI, M. 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**, v. 97, p. 71-79, 2009.

PADILHA, J. H. D.; RIBAS, L. L. F.; AMANO, E.; QUOIRIN, M. Somatic embryogenesis in *Acrocomia aculeata* Jacq. (Lodd.) ex Mart using the thin cell layer technique. **Acta Botanica Brasilica**, v. 29, n. 4, p. 516-523, 2015.

PÁDUA, M. S.; PAIVA, L. V.; LABORY, C. R. G.; ALVES, E.; STEIN, V. C. Induction and characterization of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) pro-embryogenic masses. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 4, p. 1545-1556, 2013.

PÁDUA, M. S.; SANTOS, R. S.; LABORY, C. R. G.; STEIN, V. C.; MENDONÇA, E. G.; ALVES, E.; PAIVA, L. V. Histodifferentiation of oil palm somatic embryo development at low auxin concentration. **Protoplasma**, p. 1-11, 2017.

PALANYANDY, S. R.; GANTAIT, S.; SURANTHRAN, P.; SINNIAH, U. R.; SUBRAMANIAM, S. Storage of encapsulated oil palm polyembryoids: influence of temperature and duration. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 51, n. 1, p. 118-124, 2015.

PAN, X.; YANG, X.; LIN, G.; ZOU, R.; CHEN, H.; SAMAJ, J.; XU, C. Ultrastructural changes and the distribution of arabinogalactan proteins during somatic embryogenesis of banana (*Musa* spp. AAA cv. 'Yueyoukang 1'). **Physiologia Plantarum**, v. 142, p. 372-389, 2011.

PASTERNAK, T. P.; PRINSEN, E.; AYAYDIN, F.; MISKOLCZI, P.; POTTERS, G.; ASARD, H.; VANONCKELEN, H. A.; DUDITS, D.; FEHÉR, A. The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast derived cells of alfalfa. **Plant Physiology**, v. 129, n. 4, p. 1807-1819, 2002.

PATNAIK, D.; MAHALAKSHMI, A.; KHURANA, P. Effect of water stress and heavy metals on induction of somatic embryogenesis in wheat leaf base cultures. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 43, p. 740-745, 2005.

PAUL, A.; MITTER, K.; RAYCHAUDHURI, S. S. Effect of polyamines on *in vitro* somatic embryogenesis in *Momordica charantia* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 97, p. 303-311, 2009.

PEREIRA, C.; MONTALBÁN, I. A.; GARCÍA-MENDIGUREN, O.; GOICOA, T.; UGARTE, M. D.; CORREIA, S.; CANHOTO, J. M.; MONCALEÁN, P. *Pinus halepensis* somatic embryogenesis is affected by the physical and chemical conditions at the initial stages of the process. **Journal of Forest Research**, v. 21, n. 3, p. 143-150, 2016.

PERERA, P. I. P.; HOCHER, V.; VERDEIL, J.-L.; DOULBEAU, S.; YAKANDAWALA, D. M. D.; WEERAKOON L. K. Unfertilized ovary: a novel explant for coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 26, p. 21-28, 2007.

PERERA. P. I. P.; VIDHANAARACHCHI, V. R. M.; GUNATHILAKE, T. R.; YAKANDAWALA, D. M. D. HOCHER, V.; VERDEIL, J. L.; WEERAKOON, L. K. Effect of plant growth regulators on ovary culture of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 99, p. 73-81, 2009.

PÉREZ-NÚÑEZ, M. T.; CHAN, J. L.; SÁENZ, L.; GONZÁLEZ, 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.

PERIANEZ-RODRIGUEZ, J.; MANZANO, C.; MORENO-RISUENO, M. A. Post-embryonic organogenesis and plant regeneration from tissues: two sides of the same coin? **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. 219, p. 1-11, 2014.

PETREK, J.; ZITKA, O.; ADAM, V.; BARTUSEK, K.; ANJUM, N. A.; PEREIRA, E.; HAVEL, L.; KIZEK, R. Are Early Somatic Embryos of the Norway Spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) Organised? **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1-16, 2015.

PINTO, J. F. N.; REIS, E. F.; FALEIRO, F. G.; BARBOSA, E. C. C.; NUNES, H. F.; PINTO, J. F. N. Seleção de descritores vegetativos para caracterização de acessos de guariroba (*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, p. 832-839, 2010.

PINTO, J. F. N.; REIS, E. F.; NETTO, A.P.C.; PINTO, J. F. N.; ASSUNÇÃO, H. F.; NUNES, H. F. Efeito de diferentes tratamentos na superação da dormência de sementes da palmeira *Syagrus oleracea* Becc. **Cerne**, v. 18, n. 3, p. 487-493, 2012.

PUIGDERRAJOLS, P.; MIR, G.; MOLINAS, M. Ultrastructure of early secondary embryogenesis by multicellular and unicellular pathways in cork oak (*Quercus suber* L.). **Annals of Botany**, v. 87, p. 179-189, 2001.

- PUROHIT, S. D. Plant Cell Culture: Basic Concepts. In: PUROHIT, S. D. **Introduction to Plant Cell Tissue and Organ Culture**. Delhi: PHI Learning, 2013.
- QUINGA, L. A. P.; HERINGER, A. S.; FRAGA, H. P. F.; VIEIRA, L. N.; SILVEIRA, V.; STEINMACHER, D. A.; GUERRA, M. P. Insights into the conversion potential of *Theobroma cacao* L. somatic embryos using quantitative proteomic analysis. **Scientia Horticulturae**, v. 229, p. 65-76, 2018.
- QUIROZ-FIGUEROA, F.; ROJAS-HERRERA, R.; GALAZ-AVALOS, R. M.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Embryo production through SE can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v. 86, p. 285-301, 2006.
- RAEMAKERS, C. J. J. M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. **Euphytica**, v. 81, p. 93-107, 1995.
- RAI, M. K.; SHEKHAWAT, N. S.; GUPTA, A. K.; PHULWARIA, M.; RAM, K.; JAISWAL, U. The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 106, p. 179-190, 2011.
- RAJESH, M. K.; RADHA, E.; KARUN, A.; PARTHASARATHY, V. A. Plant regeneration from embryo-derived callus of oil palm – the effect of exogenous polyamines. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 75, p. 41-47, 2003.
- RAJESH, M. K.; RADHA, E.; SAJINI, K. K.; KARUN, A. Polyamine-induced somatic embryogenesis and plantlet regeneration in vitro from plumular explants of dwarf cultivars of coconut (*Cocos nucifera*). **The Indian Journal of Agricultural Sciences**, v.84, n. 4, p. 527-530, 2014.
- RAMÍREZ, A. M. H.; VASQUEZ, T. H.; OSORIO, T. M. O.; GARCÉS, L. A.; TRUJILLO, A. I. U. Evaluation of the potential of regeneration of different Colombian and commercial genotypes of cocoa (*Theobroma cacao* L.) via somatic embryogenesis. **Scientia Horticulturae**, v. 229, p. 148-156, 2018.
- RAO, K.S. Embryogenesis in flowering plants – recent approaches and prospects. **Journal of Biosciences**, v. 21, p. 827-841, 1996.
- RAUPP, D. S.; CHAIMSOHN, F. P. O envase de palmito de pupunha em vidro. In: KULCHETSCKI, L.; CHAIMSOHN, F.P.; GARDINGO, J. R. **Palmito pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) – a espécie, cultura, manejo agronômico, usos e processamentos**. Ponta Grossa: Editora UEPG, 2001. p.105-118.
- REE, J. F.; GUERRA, M. P. Palm (Arecaceae) somatic embryogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 51, n. 6, p. 589-602, 2015.
- REINERT, J. Über die kontrolle der morphogenese und die induktion von adventivembryonene an gewebeulturen aus karotten. **Planta**, v. 53, p. 318 -333, 1958.

REIS, R. S.; VALE, E. M.; HERINGER, A. S.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V. Putrescine induces somatic embryo development and proteomic changes in embryogenic callus of sugarcane. **Journal of Proteomics**, v. 130, p. 170-179, 2016.

ROCHA, D. I.; KURCZYŃSKA, E.; POTOCKA, I.; STEINMACHER, D. A.; OTONI, W. C. Histology and Histochemistry of Somatic Embryogenesis. In: LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. (Eds.). **Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications**. Springer: Switzerland, 2016. p. 471-494.

ROCHA, D. I.; PINTO, D. L. P.; VIEIRA, L. M.; TANAKA, F. A. O.; DORNELAS, M. C.; OTONI, W. C. Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. **Protoplasma**, v. 253, n. 2, p. 595-609, 2012.

RONCHI, V. N.; GIORGEITI, L. The Cell's Commitment to Somatic Embryogenesis. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry: Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed**. Berlin: Springer – Verlag, 1995. p. 3-19.

ROOWI, S. H.; HO, C.-L.; ALWEE, S. S. R. S.; ABDULLAH, M. O.; NAPIS, S. Isolation and characterization of differentially expressed transcripts from the suspension cells of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in response to different concentration of auxins. **Molecular Biotechnology**, v. 46, p. 1-19, 2010.

ROSE, R. J. Genetic reprogramming of plant cells in vitro via dedifferentiation or pre-existing stem cells. In: ROSE, R. J. (Ed.). **Molecular cell biology of the growth and differentiation of plant cells**. Boca Raton: CRC Press, 2016. p. 320-339.

ROSHANFEKRRAD, M.; ZARGHAMI, R.; HASSANI, H.; ZAKIZADEH, H.; SALARI, A. Effect of AGNO₃ and BAP on root as a novel explant in date palm (*Phoenix dactylifera* cv. Medjool) somatic embryogenesis. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 20, n. 1, p. 20-27, 2017.

SAÉNZ, L.; AZPEITIA, A.; CHUC-ARMENDARIZ, B.; CHAND, 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.

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

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, p. 171-178, 2012.

SALEH, E. O. L. **Fisiologia da germinação *in vitro*, embriogênese somática e conservação *ex situ* de babaçu (*Attalea speciosa* Mart. ex Spreng)**. 2016. 133 p. Tese (Doutorado em Botânica) - Instituto de Ciências Biológicas - IB, Universidade de Brasília, UnB, 2016.

SALEH, E. O. L.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Advances in somatic embryogenesis of palm trees (Arecaceae): fundamentals and review of protocols. In: MUJIB, A. (Ed.). **Somatic Embryogenesis in Ornamentals and Its Applications**. New Delhi: Springer, 2016. p. 231-254.

SAMAJ, J.; BALUSKA, F.; BOBÁK, M.; VOLKMANN, D. Extracellular matrix surface network of embryogenic units of friable maize callus contains arabinogalactan-proteins recognized by monoclonal antibody JIM4. **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 369-374, 1999.

SANDOVAL-CANCINO, G.; SÁENZ, L.; CHAN, J. L.; OROPEZA, C. Improved formation of embryogenic callus from coconut immature inflorescence explants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 52, n. 4, p. 367-378, 2016.

SANÉ, D.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; DIATTA, L. I. D.; GUÈYE, B.; DAHER, A.; SAGNA, M.; DUVAL, Y.; BORGEL, A. Influence of Growth Regulators on Callogenesis and Somatic Embryo Development in Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Sahelian Cultivars. **The Scientific World Journal**, p. 1-8, 2012.

SANÉ, D.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; GASSAMA-DIA, Y. K.; SAGNA, M.; TROUSLOT, M. F.; DUVAL, Y.; BORGEL, A. Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). **Annals of Botany**, v. 98, p. 301-308, 2006.

SANTAREM, E.; PELISSIER, B.; FINER, J. Effect of explant orientation, pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 33, p. 13-19, 1997.

SANTELLI, P.; CALBO, M. E. R.; CALBO, A. G. Fisiologia pós-colheita de frutos da palmeira *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc. (Arecaceae). **Acta Botanica Brasileira**, v. 20, n. 3, p. 523-528, 2006.

SANTOS, A. A.; RAGUSA-NETTO, J. Plant food resources exploited by Blue-and-Yellow Macaws (*Ara ararauna*, Linnaeus 1758) at an urban area in Central. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, n. 2, p. 429-437, 2014.

SARASAN, V.; RAMSAY, M. M.; ROBERTS, A.V. *In vitro* germination and induction of direct somatic embryogenesis in 'Bottle Palm' [*Hyophorbe lagenicaulis* (L. Bailey) H.E. Moore], a critically endangered Mauritian palm. **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 1107-1111, 2002.

SASI, S.; BHAT, A. I. *In vitro* elimination of *Piper yellow mottle virus* from infected black pepper through somatic embryogenesis and meristem-tip culture. **Crop Protection**, v. 103, p. 39-45, 2018.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; DA GUEDES, R. S.; FERMINO JR., P. C. P.; SILVA, T. L.; COSTA, F. H. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 46, p. 378-385, 2010.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; GUEDES, R. S.; DA 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.

SCHMIDT, E. D. L.; GUZZO, F.; TOONEN, M. A. J.; VRIES, S. C. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. **Development**, v. 124, p. 2049-2062, 1997.

SCHONES, D. E.; ZHAO, K. Genome-wide approaches to studying chromatin modifications. **Nature Reviews/Genetics**, v. 9, p. 179-191.

SCHUMANN, G.; RYSCHKA, U.; SCHULZE, J.; KLOCKEL, E. Anatomy of Somatic Embryogenesis. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry: Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed**. Berlin: Springer – Verlag, 1995. p. 71-86.

SEYDOUX, G.; BRAUN, R. E. Pathway to totipotency: lessons from germ cells. **Cell**, v. 127, p. 891-904, 2006.

SGHAIER, B.; BAHLOUL, M.; GARGOURI BOUZID, R.; DRIRA, N. Development of zygotic and somatic embryos of *Phoenix dactylifera* L. cv. Deglet Nour: comparative study. **Scientia Horticulturae**, v. 116, p. 169-175, 2008.

SGHAIER-HAMMAMI, B.; DRIRA, N.; JORRIN-NOVO, J. V. Comparative 2-de proteomic analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) somatic and zygotic embryos. **Journal of Proteomic**, v. 73, p. 161-177, 2009.

SHAHZAD, A.; SHARMA, S.; SIDDIQUI, S. A. Somatic Embryogenesis: A Valuable Strategy for Phyto-Climbing Diversity Conservation. In: SHAHZAD, A.; SHARMA, S.; SIDDIQUI, S. A. (Eds.). **Biotechnological strategies for the conservation of medicinal and ornamental climbers**. New York: Springer, 2016. p. 195-216.

SHANG, H.-H.; LIU, C.-L.; ZHANG, C.; LI F.-L.; HONG, W.-D.; LI, F.-G. Histological and ultrastructural observation reveals significant cellular differences between *Agrobacterium* transformed embryogenic and non-embryogenic calli of cotton. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 51, p. 456-465, 2009.

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

SHEARMAN, J. R.; JANTASURIYARAT, C.; SANGSRAKRU, D.; YOOCHA, T.; VANNAVICHIT, A.; TRAGOONRUNG, S.; TANGPHATSORNRUANG, S. Transcriptome analysis of normal and mantled developing oil palm flower and fruit. **Genomics**, v. 101, n. 5, p. 306-312, 2013.

SHIMOKOMAKI, M.; ABDALA, C.; FRANCA, J. F.; DRAETTA, I. S.; FIGUEIREDO, I. B.; ANGELUCCI, E. Estudo comparativo entre os palmitos de sabor

doce (palmito-juçara - *Euterpe edulis* Mart. e açaí - *Euterpe oleracea* Mart.) e de Sabor Amargo (guariroba - *Syagrus oleracea* Becc.). 1 - Composição química, péptides e aminoácidos livres. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 6, p. 69-79, 1975.

SIDKY, R. A.; ELDAWYATI, M. M. Proliferation of female inflorescences explants of date palm. **Annals of Agricultural Science**, v. 57, n. 2, p. 161-165, 2012.

SILVA, B. P.; PARENTE, J. P. Chemical properties and antiulcerogenic activity of a galactomannoglucan from *Syagrus oleracea*. **Food Chemistry**, v. 123, n. 4, p. 1076-1080, 2010.

SILVA, J. A. T.; DOBRÁNSZKI, J. Dissecting the concept of the thin cell layer: theoretical basis and practical application of the Plant Growth Correction Factor. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 33, p. 881-895, 2014.

SILVA, R. C.; CARMO, L. S.; LUIS, Z. G.; SILVA, L. P.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; MEHTA, A. Proteomic identification of differentially expressed proteins during the acquisition of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Journal of Proteomic**, v. 104, p. 112-27, 2014.

SILVA, R. C.; LUIS, Z. L.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Differential responses to somatic embryogenesis of different genotypes of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 111, p. 59-67, 2012.

SILVEIRA, C. S.; PESSANHA, C. M.; LOURENÇO, M. C. S.; NEVES JUNIOR, I. F.; MENEZES, S.; KAPLAN, M. A. C. Atividade antimicrobiana dos frutos de *Syagrus oleracea* e *Mauritia vinifera*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, n. 2, p. 143-148, 2005.

SILVEIRA, V.; VITA, A. M.; MACEDO, A. F.; DIAS, M. F. R.; FLOH, E. I. S.; SANTA-CATARINA, C. Morphological and polyamine content changes in embryogenic and non-embryogenic callus of sugarcane. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 114, n. 3, p. 351-64, 2013.

SIVANESAN, I.; LIM, M. Y.; JEONG, B. R. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf and petiole explants of *Campanula punctata* Lam. var. *rubriflora* Makino. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 107, p. 365-369, 2011.

SMERTENKO, A.; BOZHKO, P. V. Somatic embryogenesis: life and death processes during apical-basal patterning. **Journal of Experimental Botany**, p. 1-18, 2014.

SMITH, D. L.; KRICKORIAN, A. D. Release of somatic embryogenic potential from excised zygotic embryos of carrot and maintenance of proembryonic cultures in hormone-free medium. **American Journal of Botany**, v. 76, p. 1832-1843, 1989.

SOARES, T. C.; SILVA, C. R. C.; CARVALHO, J. M. F. C.; CAVALCANTI, J. J. V.; LIMA, L. M.; FILHO, P. A. M.; SEVERINO, L. S.; SANTOS, R. C. Validating a probe from GhSERK1 gene for selection of cotton genotypes with somatic embryogenic capacity. **Journal of Biotechnology**, v. 270, p. 44-50, 2018.

SOARES, K. P.; PIMENTA, R. S.; GUIMARÃES, C. A. Duas novas espécies de *Syagrus* Mart. (ARECACEAE) para o Brasil. **Ciência Florestal**, v. 23, n. 3, p. 417-426, 2013.

SOLÍS-RAMOS, L. Y.; ANDRADE-TORRES, A.; CARBONELL, L. A. S.; SALÍN, C. M. O.; SERNA, E. C. Somatic embryogenesis in recalcitrant plants. In: SATO, K. I. (Ed.). **Embryogenesis**. Rijeka: InTech, 2012. p. 597-618.

STARITSKY, G. Tissue culture of the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) as a tool for its vegetative propagation. **Euphytica**, v. 19, p. 288-292, 1970.

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

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, p. 15-22, 2007.

STEINMACHER, D. A.; GUERRA, M. P.; SAARE-SURMINSKI, K.; LIEBEREI, R. A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, v. 108, n. 8, p. 1463-1475, 2011.

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, morphohistological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation. **Annals of Botany**, v. 100, p. 699-709, 2007b.

STEWART, F. C.; MAPES M. O.; MEARS K. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in culture grown freely suspended cells. **American Journal of Botany**, v. 45, p. 705-708, 1958.

SU, Y. H.; ZHAO, X. Y.; LIU, Y. B.; ZHANG, C. L.; O'NEILL, S. D.; ZHANG, X. S. Auxin-induced WUS expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 59, 448-460, 2009.

SUGIMOTO, K.; GORDON, S. P.; MEYEROWITZ, E. M. Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? **Trends Cell Biology**, v. 21, p. 212-218, 2011.

SUGIYAMA, M. Historical review of research on plant cell dedifferentiation. **Journal of Plant Research**, v. 28, p. 349-359, 2015.

SUHASINI, K; SAGARE, A.; SAINKAR, S.; KRISHNAMURTHY, K. Comparative study of the development of zygotic and somatic embryos of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Plant Science**, v. 128, p. 207-216, 1997.

SUMARYONO; RIYADIA, I.; KASIA, P. D.; GINTING, G. Growth and differentiation of embryogenic callus and somatic embryos of oil palm (*Elaeis*

guineensis jacq.) in temporary immersion system. **Indonesian Journal of Agriculture**, v. 1, n. 2, p. 109-114, 2008.

SURANTHRAN, P.; GANTAIT, S.; SINNIH, U. R.; SUBRAMANIAM, S.; ALWEE, S. S. R. S.; ROOWI, S. H. Effect of loading and vitrification solutions on survival of cryopreserved oil palm polyembryoids. **Plant Growth Regulation**, v. 66, p. 101-109, 2012.

SYUHADA, W. N.; RASID, O. A.; PARVEEZ, G. K. A. Evaluation on the effects of culture medium on regeneration of oil palm plantlets from immature embryos (ie), **Journal of Oil Palm Research**, v. 28, n. 2, p. 234-239, 2016.

TAGIPUR, E. M.; SEKER, G.; SILVA, J. A. T.; MENDI, Y. Y. Somatic embryogenesis, cryopreservation, and *in vitro* mutagenesis in *Cyclamen*. In: MUJIB, A. (Ed.). **Somatic Embryogenesis in Ornamentals and Its Applications**. New Delhi: Springer, 2016. p. 155-168.

TAHA, R. A.; HASSAN, M. M. Using low levels of seawater to enhance growth and development of date palm embryogenic cultures. **Asian Journal of Agricultural Sciences**, v. 6, n. 2, p. 69-74, 2014.

TAKEDA, T.; HAYAKAWA, F.; OE, K.; MATSUOKA, H. Effects of exogenous polyamines on embryogenic carrot cells. **Biochemical Engineering Journal**, v. 12, p. 21-28, 2002.

TALAPATRA, S.; GOSWAMI, P.; DAS, S.; RAYCHAUDHURI, S. S. Role of SERK during somatic embryogenesis and its interaction with brassinosteroids. In: MUJIB, A. (Ed.). **Somatic Embryogenesis in Ornamentals and Its Applications**. New Delhi: Springer, 2016. p. 141-154.

TAMARU, H. Confining euchromatin/heterochromatin territory: jumonji crossestheline. **Genes & Development**, v. 24, p. 1465-1478, 2010.

TAN, Y.; HU, W.; XU, X.; ZHOU, J.; WANG, C.; LIU, X.; CHENG, G. Polyamine plays a role in subculture growth of *in vitro* callus of *Indica* rice. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, v. 59, n. 1, 2017.

TAO, L.; YANG, Y.; WANG, Q.; YOU, X. Callose deposition is required for somatic embryogenesis in plasmolyzed *Eleutherococcus senticosus* zygotic embryos. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 14115-14126, 2012.

TCHORBADJIEVA, M. I. Advances in Proteomics of Somatic Embryogenesis. In: MUJIB, A. (Ed.). **Somatic Embryogenesis in Ornamentals and Its Applications**. New Delhi: Springer, 2016. p. 67-90.

TE-CHATO, S.; HILAE, A. High-frequency plant regeneration through secondary somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *tenera*). **Journal of Agricultural Technology**, v.3, n. 2, p. 345-357, 2007.

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

TEIXEIRA, J. B.; SÖNDAHL, M. R.; KIRBY, E. G. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 34, p. 227-233, 1993.

TEIXEIRA, J. B.; SÖNDAHL, M. R.; NAKAMURA, T.; KIRBY, E. G. Establishment of oil palm cell suspensions and plant regeneration. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 40, p. 105-111, 1995.

TESTILLANO, P. S.; RISUEÑO, M. C. Tracking gene and protein expression during microspore embryogenesis by confocal laser scanning microscopy. In: TOURAEV, A.; FORSTER, B. P.; JAIN, S. M. (Eds). **Advances in haploid production in higher plants**. Heidelberg: Springer-Verlag, 339-347, 2009.

THUZAR, M.; VANAVICHIT, A.; TRAGOONRUNG, S.; JANTASURIYARAT, C. Efficient and rapid plant regeneration of oil palm zygotic embryos cv. 'Tenera' through somatic embryogenesis. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, p. 123-128, 2011.

TISSERAT, B. Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in vitro. **Journal of Experimental Botany**, v. 30, n. 119, p. 1275-1283, 1979.

TOMLINSON, P. B.; HUGGETT, B. A. Cell longevity and sustained primary growth in palm stems. **American Journal of Botany**, v. 99, n. 12, p. 1891-1902, 2012.

TORRES, M. C. L.; SOARES, N. F. F.; MAIA, J. F. Parâmetros cinéticos da Glutathione S-Transferase e sua ativação por extratos de vegetais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 243-248, 2004.

UZELAC, M.; SHIMOKOMAKI, M.; ABDALA, C.; FRANCA, J. F. Estudos Comparativos entre os palmitos de sabor doce (palmito-juçara - *Euterpe edulis* Mart. e açaí - *Euterpe oleracea* Mart.) e de sabor amargo (guariroba - *Syagrus oleracea* Becc.). 2 - Compostos fenólicos. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 7, p. 371-383, 1976.

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, p. 149-15, 1987.

VÁZQUEZ-FLOTA, F. A.; MONFORTE-GONZÁLEZ, M.; MIRANDA-HAM, M. L. Application of Somatic Embryogenesis to Secondary Metabolite-Producing Plants. In: LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. (Eds.). **Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications**. Springer: Switzerland, 2016. p. 455-469.

VENKATACHALAM, P.; GEETHA, N.; PRIYA, P.; JAYABALAN, N.; SITA, G. L. Somatic embryogenesis. In: JAIWAL, P. K.; SINGH, R. P. (Eds.). **Improvement Strategies for Leguminosae Biotechnology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 87-132.

VERAMENDI, J.; NAVARRO, L. Influence of physical of nutrient medium and sucrose on somatic embryogenesis of date palm. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 45, p. 159-164, 1996.

VERDEIL, J. L.; ALEMANNI, L.; NIEMENAK, N.; TRAMBARGER, T. J. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? **Trends in Plant Science**, v. 12, p. 245-252, 2007.

VERDEIL, J. L.; BUFFARD-MOREL, J.; PANNETIER, C. Embryogénèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) à partir de tissus foliaires et inflorescenciels: bilan des recherches et perspectives. **Oléagineux**, v. 44, p. 403-411, 1989.

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

VERDEIL, J. L.; HOCHER, V.; HUET, C.; GROSDÉMANGE, F.; ESCOUTE, J.; FERRIERE, N.; NICOLE, M. Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence. **Annals of Botany**, v. 88, p. 9-18, 2001.

VIÑAS, M.; JIMÉNEZ, V. M. Factores que influyen en la embriogénesis somática *in vitro* de palmas (Arecaceae). **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 13, p. 229-242, 2011.

VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHOKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 233-249. 2002.

VONDRÁKOVÁ, Z.; ELIÁSOVÁ, K.; VÁGNER, M.; MARTINCOVÁ, O.; CVIKROVÁ, M. Exogenous putrescine affects endogenous polyamine levels and the development of *Picea abies* somatic embryos. **Plant Growth Regulation**, v. 75, p. 405-414, 2015.

VRIES, S. C.; BOOIJ, H.; MEYERINK, P.; HUISMAN, G.; WILDE, H. D.; THOMAS, T. L.; VAN KAMMEN, A. Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension cultures. **Planta**, v. 176, p. 196-204, 1988.

WANG, H. C.; CHEN, J. T.; CHANG, W. C. Morphogenetic routes of long-term embryogenic callus culture of *Areca catechu*. **Biologia Plantarum**, v. 54, p. 1-5, 2010.

WANG, H. C.; CHEN, J. T.; WU, S. P.; LIN, M. C.; CHANG, W. C. Plant regeneration through somatic embryogenesis from zygotic embryo-derived callus of *Areca catechu* L. (Arecaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 39, p. 34-36, 2003.

WANG, H. C.; CHEN, J.T.; CHANG, W. C. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf, root and stem-derived callus cultures of *Areca catechu*. **Biologia Plantarum**, v. 50, n. 2, p. 279-282, 2006.

- WANG, K. L.; LI, H.; ECKER, J. R. Ethylene biosynthesis and signaling networks. **Plant Cell**, v. 14, p. 131-151, 2002.
- WANG, X.; SHI, L.; LIN, G.; PAN, X.; CHEN, H.; WU, X.; TAKÁČ, T.; SAMAJ, J.; XU, C. A systematic comparison of embryogenic and non-embryogenic cells of banana (*Musa* spp. AAA): Ultrastructural, biochemical and cell wall component analyses. **Scientia Horticulturae**, v. 159, p. 178-185, 2013.
- WICKRAMASURIYA, A. M.; DUNWELL, J. M. Global scale transcriptome analysis of *Arabidopsis* embryogenesis *in vitro*. **BMC Genomics**, v.16, n. 301, p. 1-23, 2015.
- WIENDI, N. M. A.; CONSTANTIN, M.; WACHYAR, A. Study of Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) *In Vitro* Embryogenesis using Young Leaf Explants. **Journal of Tropical Crop Science**, v. 2, n. 2, p. 5-9, 2015.
- WILLIAMS, E. S.; MAHESWARAN, B. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, v. 57, p. 443-462, 1986.
- WINKELMANN, T. Somatic versus zygotic embryogenesis: learning from seeds. In: GERMANÀ, M. A.; LAMBARDI, M. (Eds.). **In vitro embryogenesis in higher plants - Methods in molecular biology**. New York: Springer, 2016. p. 25-46.
- WU, J.; LIU, C.; SENG, S.; KHAN, M. A.; SUI, J.; GONG, B.; LIU, C.; WU, C.; ZHONG, X.; HE, J.; YI, M. Somatic embryogenesis and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Gladiolus hybridus* cv. 'Advance Red'. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 120, p. 717-728, 2015.
- YANG, J. L.; SEONG, E. S.; KIM, M. J.; GHIMIRE, B. K.; KANG, W. H.; YU, C. Y.; LI, C. H. Direct somatic embryogenesis from pericycle cells of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) root explants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 100, p. 49-51, 2010.
- YANG, X. Y.; ZHANG, X. L. Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 29, n. 1, p. 36-57, 2010.
- YEUNG, E. C. Structural and development patterns in somatic embryogenesis. In: THORPE, T. A. (Ed.). **In Vitro Embryogenesis in Plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 205-247. 1995.
- YOU, X. L.; YI, J. S.; CHOI, Y. E. Cellular change and callose accumulation in zygotic embryos of *Eleutherococcus senticosus* caused by plasmolyzing pretreatment result in high frequency of single-cell-derived somatic embryogenesis. **Protoplasma**, v. 227, p. 105-112, 2006.
- YUSNITA; HAPSORO, D. *In vitro* callus induction and embryogenesis of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from leaf explants. **Hayati Journal of Biosciences**, v. 18, n. 2, p. 61-65, 2011.

- 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, 1-9, 2010.
- ZAYED, E. M. M.; ABD ELBAR, O. H. Morphogenesis of immature female inflorescences of date palm *in vitro*. **Annals of Agricultural Science**, v. 60, n. 1, p. 113-120, 2015.
- ZAYED, E. M. M.; ZEIN EL DIN, A. F. M.; MANAF, H. H.; ABDELBAR, O. H. Floral reversion of mature inflorescence of date palm *in vitro*. **Annals of Agricultural Science**, p. 1-9, 2016.
- ZEGZOUTI, R.; ARNOULD, M.-F.; FAVRE, J.-M. Histological investigation of the multiplication steps in secondary somatic embryogenesis of *Quercus robur* L. **Annals of Forest Science**, v. 58, p. 681-690, 2001.
- ZENG, F.; ZHANG, X.; JIN, S.; CHENG, L.; LIANG, S.; HU, L.; GUO, X.; NIE, Y.; CAO, J. Chromatin reorganization and endogenous auxin/cytokinin dynamic activity during somatic embryogenesis of cultured cotton cell. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 90, p. 63-70, 2007.
- ZHOU, T.; YANG, X.; GUO, K.; DENG, J.; XU, J.; GAO, W.; LINDSEY, K.; ZHANG, X. ROS homeostasis regulates somatic embryogenesis via the regulation of auxin signaling in cotton. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 15, p. 2108-2124, 2016.
- ZHOU, X.; ZHENG, R.; LIU, G.; XU, Y.; ZHOU, Y.; LAUX, T.; ZHEN, Y.; HARDING, S. A.; SHI, J.; CHEN, J. Desiccation treatment and endogenous iaa levels are key factors influencing high frequency somatic embryogenesis in *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. 2054, p. 1-15, 2017.
- ZHU, H.-G.; CHENG, W.-H.; TIAN, W.-G.; LI, Y.-J.; LIU, F.; XUE, F.; ZHU, Q.-H.; SUN, Y.-Q.; SUN, J. iTRAQ-based comparative proteomic analysis provides insights into somatic embryogenesis in *Gossypium hirsutum* L. **Plant Molecular Biology**, p. 1-14, 2017.
- ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, v. 5, p. 1411-1423, 1993.
- ZOUINE, J.; EL BELLAJ, M.; MEDDICH, A.; VERDEIL, J.-L.; EL HADRAMI, I. Proliferation and germination of somatic embryos from embryogenic suspension cultures in *Phoenix dactylifera*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 82, p. 83-92, 2005.
- ZOYSA, N. Arecaceae. In: DASSANAYAKE, M. D.; CLAYTON, W. D. (Eds.). **Revised Handbook to the Flora of Ceylon**. Netherlands: Balkema Publishers. 2000. p. 33-93.

CAPÍTULO II

TRANSIÇÃO DE CÉLULAS SOMÁTICAS PARA EMBRIOGÊNICAS E FORMAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE GUEROBA [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] COM ÊNFASE EM ASPECTOS MORFOANATÔMICOS, HISTOQUÍMICOS E ULTRAESTRUTURAIS

TRANSIÇÃO DE CÉLULAS SOMÁTICAS PARA EMBRIOGÊNICAS E FORMAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE GUEROBA [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] COM ÊNFASE EM ASPECTOS MORFOANATÔMICOS, HISTOQUÍMICOS E ULTRAESTRUTURAIS

RESUMO

Nesse trabalho são apresentados novos conhecimentos relacionados aos aspectos morfo-histológicos, histoquímicos e ultraestruturais da transição de células somáticas para embriogênicas de embriões zigóticos maduros de *Syagrus oleracea* (gueroba), uma palmeira nativa do Brasil e de relevante importância econômica para a região central do país. Os resultados apoiam o conceito geral de que o ácido 2,4-diclorofenoxiacético - 2,4-D (13,57 μ M) desempenha um papel crítico na redeterminação mínima necessária para a formação de embriões somáticos de origem direta e multicelular, a partir de células localizadas, sobretudo, na protoderme e subprotoderme de embriões zigóticos de gueroba. Conforme as análises anatômicas e ultraestruturais, sete dias em meio de indução com auxina foram suficientes para a identificação de células embriogênicas, previamente, à visualização de alterações morfológicas significativas. Essas células apresentavam envelope nuclear irregular, predomínio de um único nucléolo e baixo conteúdo de heterocromatina, características que as enquadram no conceito de *stem cell* totipotente, além de exibirem intensa atividade metabólica. Nesse estudo, também diferenciaram-se células embriogênicas de meristemáticas com base em observações por Microscopia Eletrônica de Transmissão. Aos 14 dias em meio de indução, formações nodulares translúcidas foram observadas na região distal de embriões inoculados, as quais evoluíram posteriormente para embriões somáticos globulares (a partir dos 30 dias de cultivo), caracterizados pela presença de protoderme definida e ausência de conexão vascular com o explante de origem. Além dessas formações, caracterizadas como construções multicelulares de origem direta, a partir dos 14 dias em meio de indução, observaram-se proembriões derivados de células localizadas nas proximidades dos feixes procambiais, que não evoluíram para embriões somáticos. Proembriões formados a partir de células localizadas mais próximas do meio de cultura exibiam em suas proximidades uma barreira fenólica conspícua, provavelmente, com função protetiva contra o excesso de 2,4-D. Além de formações embriogênicas diretas, massas calogênicas foram observadas principalmente aos 90 dias de cultivo. A permanência dos explantes por 120 dias em meio de indução comprometeu a qualidade dos embriões somáticos obtidos. A dinâmica da mobilização de compostos de reserva correlacionados com a diferenciação de embriões somáticos também foi demonstrada, com destaque para amido e proteína como fontes de energia necessárias ao processo. Segundo as análises histoquímicas, esses compostos, embora úteis em termos de suprimento energético, não podem ser considerados marcadores da competência embriogênica nesse sistema. Esse estudo demonstra que embriões zigóticos de gueroba provê um modelo útil para a investigação dos eventos iniciais da embriogênese somática e expõe de forma inédita em palmeiras os eventos anatômicos envolvidos na embriogênese somática direta.

Palavras-chaves: Arecaceae; embrião zigótico; auxina; histologia; Microscopia Eletrônica de Transmissão; embriogênese somática direta.

TRANSITION OF SOMATIC TO EMBRYOGENIC CELLS AND FORMATION OF SOMATIC EMBRYOS IN GUEROBA [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] WITH EMPHASIS IN MORPHANATOMIC, HISTOCHEMICAL AND ULTRASTRUCTURAL ASPECTS

ABSTRACT

The present work presents new knowledge related to the morphological, histochemical and ultrastructural aspects of the transition from somatic to embryogenic cells of mature zygotic embryos of *Syagrus oleracea* (gueroba), a native palm to Brazil and with relevant economic importance for the central region of the country. The results support the general concept that 2,4-dichlorophenoxyacetic acid - 2,4-D (13.57 μM) plays a critical role in the minimal redetermination required for the formation of somatic embryos of direct and multicellular origin, from cells located, mainly, in the protoderm and subprotoderm of gueroba zygotic embryos. According to the anatomical and ultrastructural analysis, seven days in half induction medium with auxin were sufficient for the identification of embryogenic cells, previously, to the visualization of significant morphological alterations. These cells had irregular nuclear envelope, predominant presence of a single nucleolus and low content of heterochromatin, characteristics that fit them into the concept of totipotent stem cells, besides exhibiting intense metabolic activity. In this study, embryogenic cells were also differentiated from meristematic, based on observations by Transmission Electron Microscopy. At 14 days in induction medium, translucent nodular formations were observed in the distal region of inoculated embryos, which later developed into globular somatic embryos (from 30 days of culture), characterized by the presence of defined protoderm and absence of vascular connection with the origin explant. In addition to these formations, characterized as multicellular constructs of direct origin, from 14 days in induction medium, proembryos derived from cells located close the procambial bundles, which did not evolve for somatic embryos, were observed. Proembryos formed from cells located closer to the culture medium exhibited in their vicinity a conspicuous phenolic barrier, probably with a protective function against excess of 2,4-D. In addition to direct embryogenic formations, calogenic masses were observed mainly at 90 days of culture. The permanency of explants for 120 days in induction medium compromised the quality of the somatic embryos. The dynamics of the mobilization of reserve compounds correlated with somatic embryo differentiation was also demonstrated, with emphasis on starch and protein as energy sources required for the process. According to histochemical analyzes, these compounds, although useful in terms of energy supply, should not be considered markers of embryogenic competence in this system. This study demonstrates that zygotic embryos of gueroba provide a useful model for the investigation of the initial events of somatic embryogenesis and exposes in an unprecedented manner in palm trees anatomical events involved in direct somatic embryogenesis.

Keywords: Areaceae; zygotic embryo; auxin; histology; Transmission Electron Microscopy; direct somatic embryogenesis.

1. INTRODUÇÃO

A embriogênese somática é um exemplo da alta plasticidade que as células vegetais exibem (FEHÉR, 2015) e é considerada ainda, apesar da exaustiva literatura sobre o tema, um mistério para a ciência (VOGEL, 2005). Essa técnica explora o potencial morfogênico celular “liberado” pela exposição de diferentes fontes de explantes (embriões zigóticos, inflorescências, ápices caulinares, folhas imaturas e outros) a variados estresses e/ou reguladores de crescimento (FEHÉR, 2015). Em termos conceituais, tem sido descrita como um processo multietapas que envolve a transição de células somáticas para estruturas similares a embriões zigóticos (EMONS, 1994), sem que ocorra fusão de gametas (WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986). Essas estruturas, também conhecidas como embriões somáticos, são bipolares, sem conexão vascular com o tecido de origem (SCHUMANN *et al.*, 1995; VON ARNOLD *et al.*, 2002; HORSTMAN; BEMER; BOUTILIER, 2017) e capazes de regenerar plantas inteiras.

Uma das mais atrativas aplicações da embriogênese somática é a possibilidade de propagação massiva de culturas comerciais (VON ARNOLD *et al.*, 2002). É indicada especialmente para várias espécies de palmeiras, dadas as dificuldades de propagação pelos métodos convencionais e a necessidade de propagação clonal de genótipos superiores. Além do mais, a embriogênese somática tem se tornado um modelo dominante para estudos moleculares, citológicos, fisiológicos e de desenvolvimento do processo embriogênico vegetal (QUIROZ-FIGUEROA *et al.*, 2006; KARAMI; SAID, 2010; YANG; ZAHNG, 2010; MAHDAVI-DARVARI; NOOR; ISMANIZAN, 2014; LELJAK-LEVANIĆ; MIHALJEVIC; BAUER, 2015; ELHITI; STASOLLA, 2016).

O tipo de explante e o seu estágio de desenvolvimento são, provavelmente, os fatores mais importantes na determinação da capacidade embriogênica de uma cultura (GAJ, 2004) e da rota de desenvolvimento dos embriões somáticos, que pode ser direta e indireta. Na embriogênese somática direta, as células já apresentam competência embriogênica (células pré-embriogênicas determinadas) e requerem uma reprogramação gênica mínima (HORSTMAN; BEMER; BOUTILIER, 2017) para a formação do embrião (sem etapa de desdiferenciação), diferentemente do que ocorre na embriogênese somática indireta. Nesta, as células requerem uma reprogramação gênica maior para aquisição do estado de competência embriogênica (indução de células

embriogênicas determinadas), que é antecedida pela proliferação de células – calos (SHARP *et al.*, 1980; WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986; YEUNG, 1995). Conforme Horstman, Bemer e Boutilier (2017), na embriogênese somática direta, genes relacionados à totipotência estão mais acessíveis à maquinaria transcricional. Apesar do conhecimento clássico sobre a aquisição de competência embriogênica, em monocotiledôneas, especialmente em palmeiras, os eventos celulares subjacentes a esse processo e à consequente transição de células somáticas para o estado celular embriogênico ainda continuam pouco esclarecidos.

A maioria dos estudos em palmeiras descreve protocolos para regeneração de plantas, mas com pouca ou nenhuma elucidação das características histológicas, histoquímicas e ultraestruturais envolvidas no processo. Dentro desse contexto e partindo da ideia de que a competência embriogênica em monocotiledôneas está restrita às células de origem embrionária ou meristemática (FEHÉR, 2006), objetivou-se investigar os eventos iniciais da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos maduros de *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc., uma palmeira popularmente conhecida como gueroba, de relevante importância econômica na região central do Brasil, de fácil acesso e com alta disponibilidade de material para pesquisa. Adicionalmente, a partir de análises anatômicas e histoquímicas, combinadas à Microscopia Eletrônica de Transmissão, objetivou-se investigar as seguintes questões-chaves nesse trabalho: i) quais células podem ter tais estados predeterminados e onde estão localizadas dentro do explante em questão; ii) quais características (histológicas, histoquímicas e ultraestruturais) enquadram as células dentro da categoria pré-embriogênicas determinadas e, portanto, associadas com o conceito de *stem cell* totipotente (VERDEIL *et al.*, 2007), e iii) qual o período de tempo necessário para a reprogramação gênica mínima para a formação de embriões somáticos de *S. oleracea* a partir de embriões zigóticos maduros. Enfatizou-se também a mobilização de reservas espacial e temporalmente durante todo o processo embriogênico, o que permitiu identificar regiões que exigem alta demanda energética.

Salienta-se que este é o primeiro estudo realizado sobre a origem e formação de embriões somáticos no gênero *Syagrus*. Aspectos celulares detalhados da embriogênese somática, usando microscopias óptica e eletrônica, combinadas com análises histoquímicas, são mostrados também pela primeira vez durante a embriogênese somática direta em uma palmeira. A caracterização dos aspectos supracitados é de significativa importância para a identificação de marcadores precoces e confiáveis da

competência embriogênica em palmeiras, bem como para elucidação dos eventos envolvidos no processo e consequente otimização do tempo para a obtenção de embriões somáticos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), situado em Brasília-DF.

2.1 Material vegetal

Embriões zigóticos foram obtidos de sementes de frutos em estágio fisiológico maduro de plantas adultas de gueroaba (*Syagrus oleracea*). O critério para coleta dos frutos considerado foi o epicarpo com coloração variando entre verde-amarelo a amarelo e mesocarpo amarelado com consistência macia. As matrizes foram selecionadas, em função do seu estado fitossanitário e da alta produtividade, de uma população localizada no município de Itaberaí, Goiás, Brasil (Coordenadas 16°4'28.12" S e 49°43'18.08" O) (Anexo 1).

Após a coleta, os frutos foram secos à sombra (à temperatura ambiente) por 30 dias e, para a extração da semente do seu interior, foi utilizado um torno de bancada. A desinfestação das sementes foi realizada em câmara de fluxo laminar, por imersão em álcool etílico 70% (v/v), durante cinco minutos, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) (2,5% de cloro ativo) por 40 min. Três sucessivas lavagens foram realizadas em água destilada e autoclavada, por um minuto cada, para retirar o excesso de NaOCl. Logo depois, em condições assépticas, as sementes foram seccionadas e os embriões isolados com auxílio de um bisturi, alicate dentário e uma pinça de ponta fina.

2.2 Indução de embriões somáticos

Embriões zigóticos maduros foram inoculados em meio basal composto pelos sais de Y3 (EEUWENS, 1976), suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 0,5 g.L⁻¹ de glutamina e 13,57 µM da auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). A fonte de Fe-EDTA e vitaminas do meio foi mantida de acordo com a concentração original do meio de cultura de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962).

Durante a fase de indução, os explantes foram cultivados em placas de *Petri* (15 x 90 mm), com aproximadamente 25 mL de meio de cultura por placa, seladas com policloreto de polivinila (PVC) transparente e armazenadas em sala de crescimento

escura à $25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$, por até 120 dias e com subcultivos mensais. Após a fase de indução, os explantes foram transferidos para meio desprovido de auxina.

Os meios usados foram gelificados com $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de *Phytigel* (Sigma, St. Louis, MO) e o pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da adição do agente gelificante. Os meios foram autoclavados por 20 minutos à 121°C e 1,5 atm de pressão.

2.3 Análises anatômica, histoquímica e ultraestrutural

Para análises anatômicas, amostras do material vegetal foram coletadas aos 0, 7, 14, 21, 30, 60, 90 e 120 dias após o estabelecimento dos explantes em meio de indução. Amostras coletadas no tempo 0 dias correspondiam a segmentos de endosperma e embriões zigóticos não inoculados. Já as amostras coletadas nos demais tempos consistiam em embriões zigóticos inteiros.

As etapas de fixação, desidratação e emblocamento do material vegetal coletado 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 M (pH 7,2), por um período de 24 h (sob vácuo durante a primeira hora), seguida de três lavagens em solução de cacodilato de sódio (0,05 M, pH 7,2), por um período de 1 hora cada (sob vácuo); logo após, desidratação em série alcoólica crescente (30%, 50%, 70% - 100%, 100%), por uma hora cada (sob vácuo) e infiltração em historesina (Leica, Heidelberg, Alemanha), segundo as especificações do fabricante.

Posteriormente, cortes longitudinais e transversais (3-7 μm) foram obtidos em micrótomo rotativo manual (Leica®, RM212RT), distendidos e aderidos às lâminas microscópicas em placa aquecida à 40°C .

As secções obtidas foram coradas com Azul de Toluidina (0,5%) para caracterização estrutural e identificação de compostos fenólicos (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1964). As secções obtidas a partir do material emblocado também foram submetidas aos seguintes testes histoquímicos: *Xylidine Ponceau* – XP utilizado para visualização de proteínas (VIDAL, 1970); *Periodic Acid Schiff* – PAS (O'BRIEN; MCCULLY, 1981) usado para identificar polissacarídeos neutros; Lugol (JOHANSEN, 1940) para detecção de grãos de amido; Sudan IV (PEARSE, 1972) para visualização de lipídeos totais; Vermelho de Rutênio para identificação de pectinas (JOHANSEN, 1940); Dicromato de Potássio para visualização de compostos fenólicos não estruturais

(GABE, 1968); Calcoflúor White para identificação de β , 1-4 glucanos, como celulose e hemicelulose (HUGHES; MCCULLY, 1975), além de Azul de Anilina para detecção de calose (β , 1-3 glucanos) (CURRIER, 1957; ESCHRICH; CURRIER, 1964), esses dois últimos corantes sob excitação com luz ultravioleta com auxílio de filtro UV de 340-380 nm. Especificamente secções do endosperma fresco foram coradas com Sudan III (PEARSE, 1972) para visualização de lipídeos totais. A obtenção e análise de imagens foram realizadas via microscópio Leica DM 750 e programa Leica Application Suite EZ.

Para a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), as amostras foram coletadas aos 0, 7, 14 e 60 dias após o estabelecimento dos explantes em meio de indução de embriões somáticos. As amostras foram fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2) e mantidas à 4° C por cerca de 24 horas. Logo após, foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio 2% em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2). Para pós-fixação, essas amostras foram imersas em acetato de uranila 0,5% (contratação *in bloc*) durante 24 horas à 4°C e desidratadas em série crescente de etanol (10 a 100%). Seguiu-se a infiltração com resina Epon 812 ©, conforme protocolo do fabricante. A inclusão foi feita em moldes próprios para polimerização à 70°C. Secções ultrafinas (60 nm de espessura) foram obtidas utilizando ultramicrótomo Leica, as quais foram contrastadas com acetato de uranila 5% por 1 hora em condições escuras. As amostras foram analisadas e fotodocumentadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET - Zeiss modelo EM 109). Medições (espessuras e diâmetros) foram realizadas por meio do Programa Image Pro Plus 6.0. Para espessuras de parede celular, 30 medições foram realizadas em diferentes pontos da parede celular de pelo menos cinco células. Para os diâmetros dos núcleos e nucléolos, foram realizadas quatro e duas medições, respectivamente, de pelo menos dez células.

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização anatômica, histoquímica e ultraestrutural

3.1.1 Endosperma e embrião zigótico

O endosperma é envolto por um tegumento amarronzado (Figura 1A) e ocupa quase a semente inteira, com uma pequena cavidade onde o embrião se encaixa (Figura 1B, D) e é denso, rígido, homogêneo, esbranquiçado, brilhante e rico em compostos de reserva que se coram com Azul de Toluidina (Figura 1E). Dentre esses compostos citam-se: possíveis corpos glicoproteicos, já que foram corados com ambos corantes, XP (Figura 2A) e PAS (Figura 2B) e corpos lipídicos (Figura 2C) corados com Sudan III.

O embrião zigótico de gueroaba é pequeno em relação ao volume total do endosperma. Ele mede cerca de 3,11 mm e apresenta uma região distal embebida no endosperma, que corresponde ao haustório (Figura 1B, C); uma porção mediana, que corresponde ao pecíolo cotiledonar e uma região proximal (basal), adjacente ao tegumento da semente, que corresponde a bainha cotiledonar (Figura 1B, C). A região proximal e a distal podem ser distinguidas pela sua coloração, onde no material fresco, imediatamente após a remoção do embrião da semente, a porção com coloração mais amarelada corresponde à região proximal, ao passo que a porção com coloração esbranquiçada corresponde à região distal (Figura 1C).

O eixo embrionário é reto e curto, localizado na região proximal, alinhado paralelamente ao comprimento do embrião (Figura 1F). Os primórdios foliares (bainhas foliares ou catafilos) e o promeristema caulinar (composto por células pequenas, isodiamétricas, arranjadas compactamente, com alta relação núcleo citoplasma, sem vacúolos evidentes) formam a plúmula (GENOVESE-MARCOMINI; MENDONÇA; CARMELLO-GUERREIRO, 2013; MAGALHÃES *et al.*, 2013) (Figura 1F, G), localizada na cavidade cotiledonar, em frente a fenda cotiledonar (Figura 1F3, F4). O eixo hipocótilo-radícula apresenta a radícula formada por cordões procambiais, meristema fundamental e promeristema radicular (com características celulares semelhantes ao promeristema caulinar) (GENOVESE-MARCOMINI; MENDONÇA; CARMELLO-GUERREIRO, 2013; MAGALHÃES *et al.*, 2013) e, diferentemente da plúmula, não possui protoderme bem diferenciada (Figura 1F). No eixo embrionário, as

células são notavelmente menores e com arranjo mais compacto em comparação com o resto das células do embrião (Figura 1F).

O cotilédone é simples e, como observado na Figura 1F, exibe protoderme, meristema fundamental e procâmbio totalmente diferenciados e facilmente distinguíveis por meio dos formatos e posições de suas células. A protoderme é unisseriada com células justapostas e com núcleos evidentes (Figura 1H, I); eventualmente, alguns prováveis estômatos são observados (Figura 1H). As células do meristema fundamental tendem a ser isodiamétricas, sobretudo, as do haustório e maiores nas regiões central e distal do cotilédone que nas regiões periférica e proximal (Figura 1F). As células procambiais são estreitas, longitudinalmente alongadas, com núcleos evidentes, e agrupadas em cordões (Figura 1I). Os cordões procambiais originados nas proximidades do nó cotiledonar são direcionados para a região do eixo embrionário e para a região distal, onde tornam-se gradualmente mais periféricos e paralelos ao comprimento do embrião (Figura 1F). O haustório apresenta invaginações (Figura 1F, F6).

Conforme análises histoquímicas, as células do embrião zigótico são ricas em proteínas concentradas em numerosos e evidentes corpos proteicos com diferentes tamanhos, conforme reação positiva com XP, sobretudo, na região do cotilédone (Figura 2D). As células procambiais exibem pouco conteúdo proteico, já suas laterais são formadas por corpos conspícuos de proteínas, fragmentadas em diferentes tamanhos (Figura 2E). Além de proteínas, alguns poucos grãos de amido, de acordo com corantes Lugol e PAS, foram observados no eixo embrionário (nos primórdios foliares) (Figura 2F) e nas suas proximidades (acima do promeristema radicular) e na extremidade haustorial (Figura 2G). Além dos compostos de reserva supracitados, observaram-se lipídeos concentrados em corpos lipídicos abundantes, conforme reação positiva com Sudan IV (Figura 2H, I). Os corpos lipídicos exibiam formato arredondado e tamanho inferior ao dos corpos proteicos (Figura 2D, E, H, I).

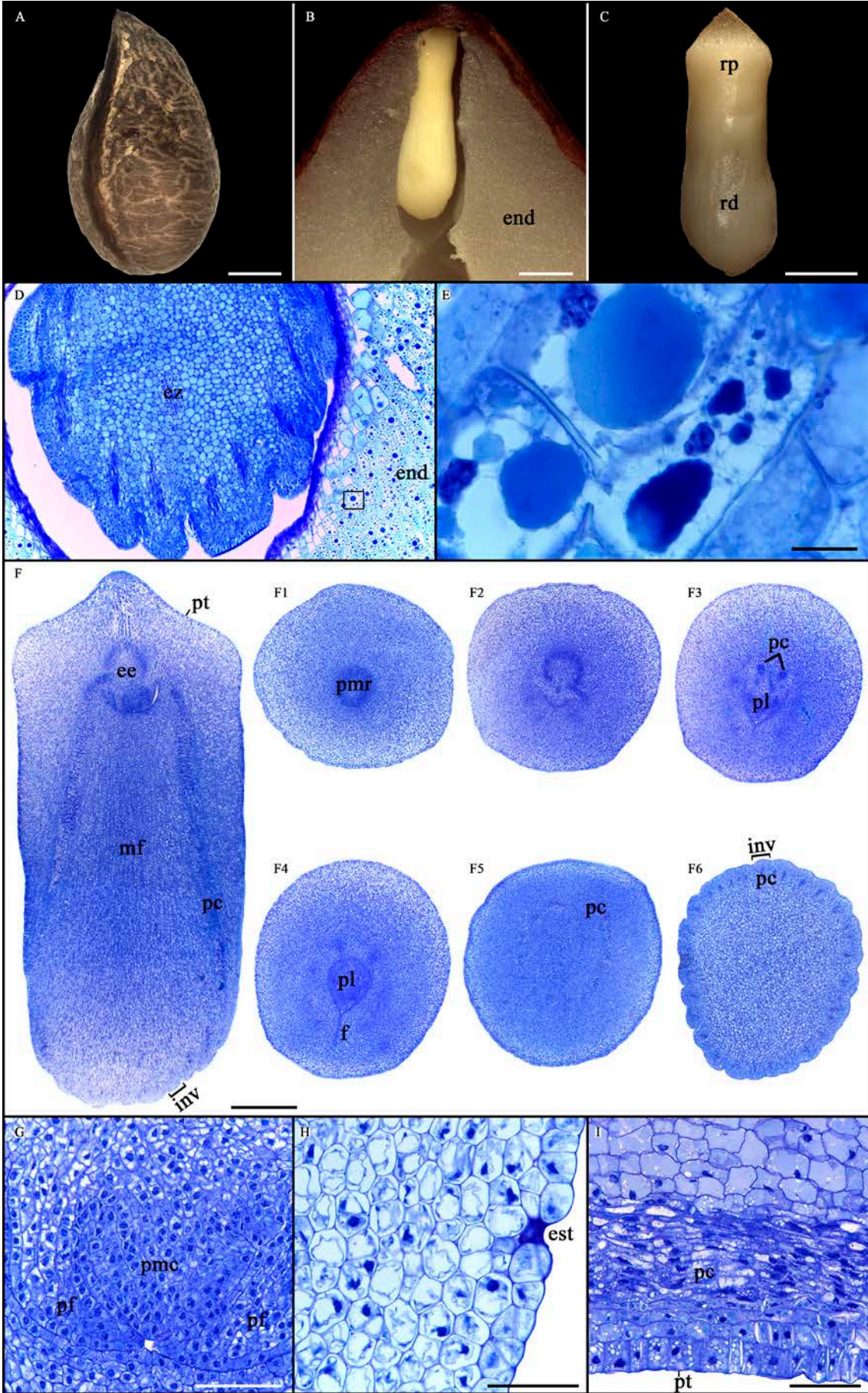


Figura 1. Semente e embrião zigótico de gueroba (*Syagrus oleracea*) (A-C, morfologia; D-I, anatomia). A: Semente. B, C: Embrião zigótico. D: Secção transversal do embrião zigótico e endosperma. E: Células do endosperma. F: Secção longitudinal do embrião zigótico (F1-F6: secções atômicas transversais). G: Plúmula. H: Provável estômato. I: Procâmbio e protoderme. Abreviações: (ee) eixo embrionário, (end) endosperma, (est) estômato, (ez) embrião zigótico, (f) fenda cotiledonar, (inv) invaginação, (mf) meristema fundamental, (pc) procâmbio, (pf) primórdio foliar, (pl) plúmula, (pmc) promeristema caulinar, (pmr) promeristema radicular, (pt) protoderme, (rd) região distal e (rp) região proximal. Barras = A: 5 mm; B, C: 1 mm; F: 500 µm; D: 200 µm; G-I: 50 µm e E: 20 µm.

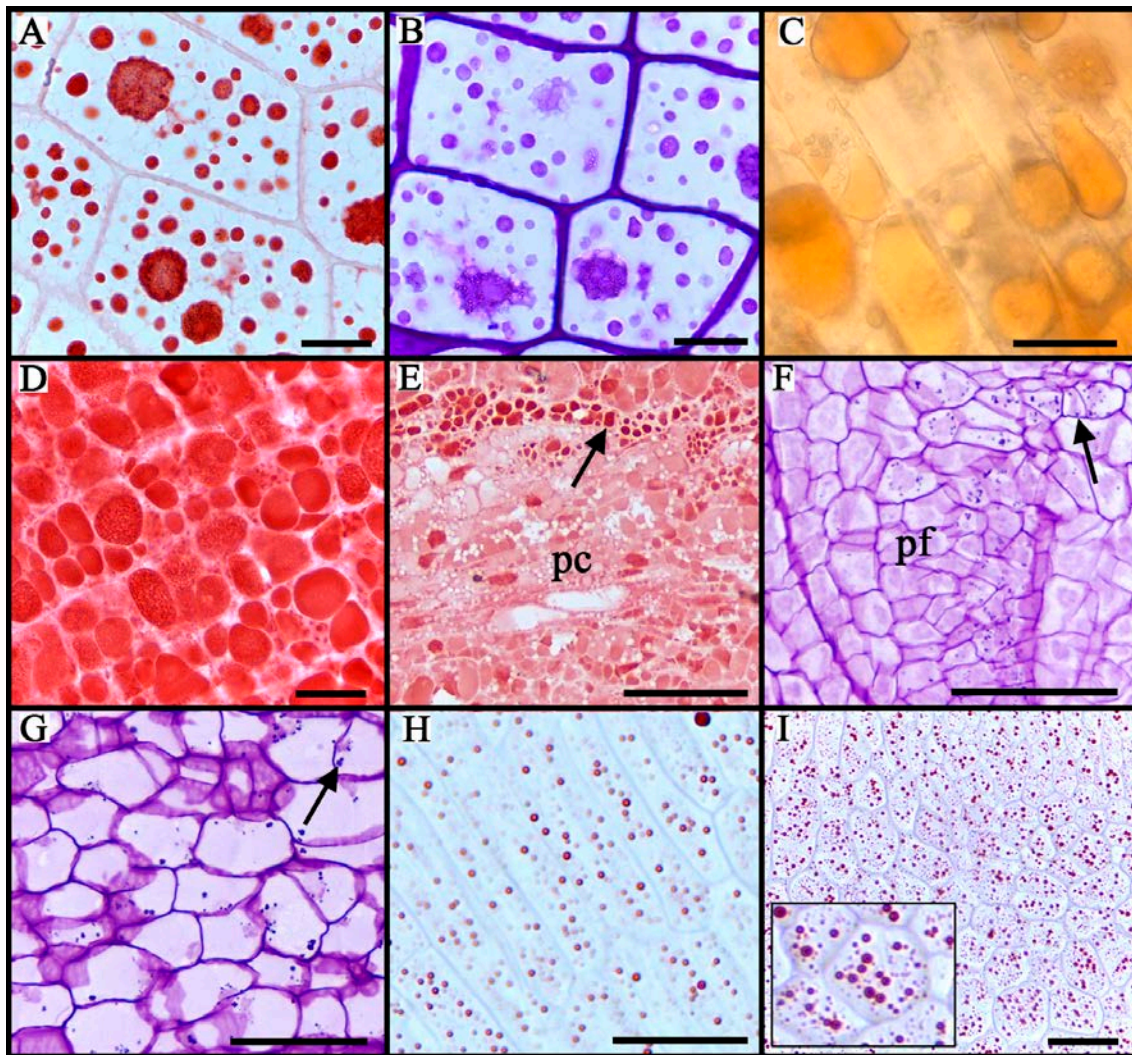


Figura 2. Histoquímica do endosperma e de um embrião zigótico de gueroba (*Syagrus oleracea*). A: Endosperma com corpos proteicos identificados com *Xylydine Ponceau*. B: Endosperma com possíveis glicoproteínas coradas com *Periodic Acid Schiff*. C: Células do endosperma com corpos lipídicos visualizados com Sudan III (material fresco). D: Corpos proteicos em células do cotilédone. E: Corpos proteicos em células adjacentes aos cordões procambiais (seta). F: Grãos de amido em células da plúmula (seta). G: Grãos de amido em células do cotilédone (seta). H, I: Corpos lipídicos em células do procâmbio e cotilédone, respectivamente. Abreviações: (pc) procâmbio e (pf) primórdio foliar. Barras = B, D, F, I: 50 μm e A, C, E, G, H: 20 μm .

Em termos ultraestruturais, segundo análise por MET, as células do meristema fundamental exibem núcleos proeminentes, não necessariamente centrais (diâmetro médio de 1,63 μm) (Tabela 1 – seção 3.1.2 - 14 dias) e sem nucléolos distinguíveis (Figura 3A, B, E) e paredes celulares com diâmetro médio de 0,14 μm (Tabela 1). Apresentam também citoplasma denso, vacúolos de tamanhos variados, sendo alguns fronteiraços com as membranas plasmáticas (Figura 3A, E). Plasmodesmos são evidentes na parede celular (Figura 3D). Já as células do procâmbio apresentam paredes

sinuosas, algumas mais citoplasmáticas, outras mais vacuoladas (Figura 3F). Outros possíveis componentes celulares como retículo endoplasmático, complexo de Golgi e mitocôndrias não foram observados.

As análises por meio de MET ratificaram as análises histoquímicas e forneceram informações adicionais. Conforme MET, corpos proteicos ocupam uma parte significativa das células e, de modo geral, exibem aspecto floculento e eletrodensidade variante (Figura 3A-C, E). Além de proteínas, vários corpos lipídicos (menores que os corpos proteicos) foram visualizados, principalmente, ao redor dos corpos proteicos e dos núcleos celulares (Figura 3A-C, E) e nas proximidades das membranas plasmáticas (Figura 3C, D). Amiloplastos não foram visualizados nas células analisadas.

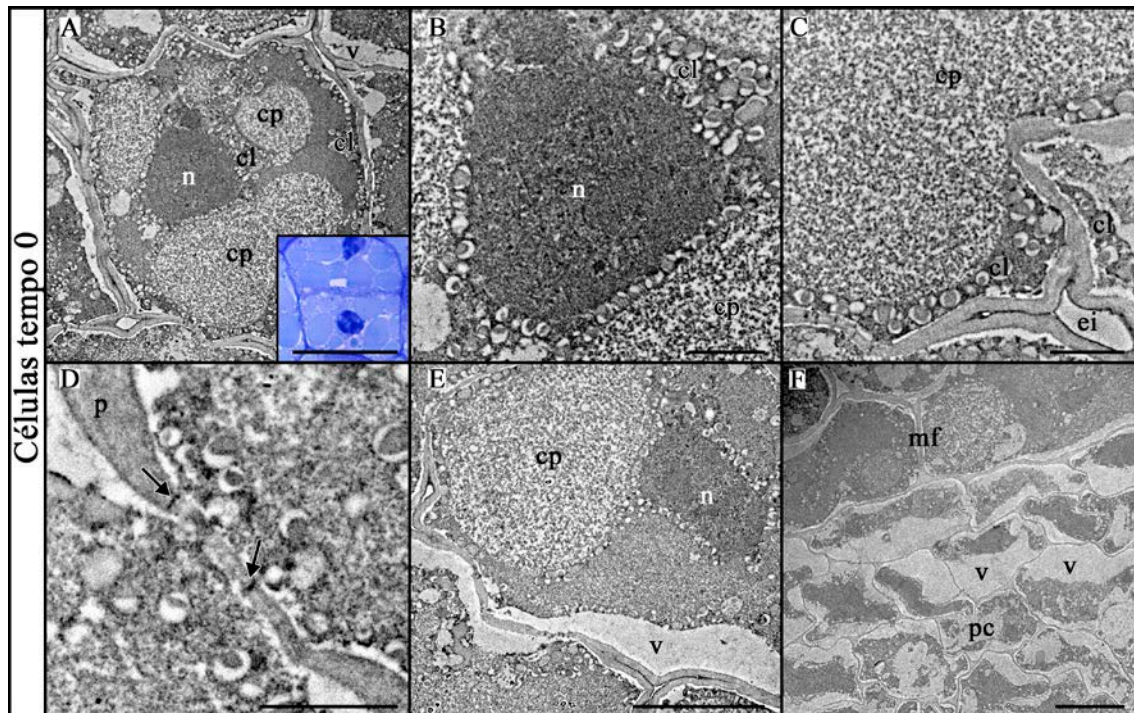


Figura 3. Caracterização ultraestrutural de células de embriões zigóticos de guieira (*Syagrus oleracea*) não inoculados (tempo 0 dias). A: Célula do meristema fundamental com núcleo proeminente e reservas proteicas e lipídicas; observar aspecto anatômico (quadrado lateral). B: Núcleo envolto por corpos lipídicos. C: Corpos proteicos, corpos lipídicos e espaço intercelular. C: Paredes celulares com plasmodesmos (setas). E: Célula do meristema fundamental com núcleo proeminente, vacúolo adjacente à parede celular e reservas proteicas e lipídicas. Abreviações: (cl) corpo lipídico, (cp) corpo proteico, (ei) espaço intercelular, (n) núcleo, (mf) meristema fundamental, (p) parede celular, (pc) procâmbio e (v) vacúolo. Barras = A, E, F: 2 μ m e B-D: 0,5 μ m.

3.1.2 Indução de embriões somáticos

7 dias

Aos 7 dias em meio de indução, quase que imperceptíveis alterações morfológicas foram observadas nos embriões zigóticos inoculados em meio suplementado com auxina, limitando-se, de modo geral, a um leve intumescimento deste (Figura 4A). Já em termos anatômicos, observaram-se três padrões de comportamento: i) embriões zigóticos sem alterações anatômicas; ii) embriões zigóticos com pequenas áreas anatomicamente reativas (com células embriogênicas) e iii) embriões zigóticos com amplas áreas anatomicamente reativas (com células embriogênicas) (Figura 4B, C). Nos reativos, as mudanças foram notificadas, sobretudo, na protoderme e subprotoderme (Figura 4B, C, E, F), no eixo embrionário e nas suas adjacências (Figura 4B, C) e nas laterais dos cordões procambiais (Figura 4B-D). Algumas das células embriogênicas encontravam-se em processo de divisão celular (Figura 4G).

As células consideradas não embriogênicas (não reativas) foram caracterizadas anatomicamente (Figura 4C-F) e ultraestruturalmente (Figura 5A-I) da seguinte forma: citoplasma pouco denso, desprovido de organelas, exceto algumas ilhas com compostos de reservas e alguns ribossomos (Figura 5B, F); núcleos evidentes (diâmetro médio de 1,44 μm) (Tabela 1), com formatos irregulares e sem nucléolos distinguíveis (Figura 5A, C, E, G, H); presença de vacúolos com tamanhos variados (Figura 5B, D); espaços intercelulares (Figura 5C).

Já as células consideradas embriogênicas (reativas) exibiam em termos anatômicos as seguintes características (Figura 4B-F): formato predominante isodiamétrico, alta relação núcleo/citoplasma, citoplasma intensamente corado com Azul de Toluidina, núcleos volumosos (diâmetro médio de 3,47 μm) (Tabela 1), nucléolos proeminentes (geralmente um) (diâmetro médio de 1,17 μm) (Tabela 1), domínios de heterocromatina nas bordas do envelope nuclear, paredes celulares mais espessas que as das células não reativas (espessura média das paredes celulares de células não embriogênicas e embriogênicas, 0,08 μm e 0,27 μm , respectivamente) (Tabela 1), vacúolos pequenos (células embriogênicas protodérmicas com menor grau de vacuolação que as demais células embriogênicas) e presença de espaços intercelulares (exceto células embriogênicas protodérmicas). As análises ultraestruturais

forneceram informações adicionais (Figura 5J-R), como presença de envelope nuclear com formatos irregulares (Figura 5J, K); abundância de mitocôndrias (distribuídas nas proximidades dos amiloplastos e ao longo de todo citoplasma), a grande maioria com formato convencional e algumas mais compridas (Figura 5L-N); retículos endoplasmáticos visíveis próximos às membranas plasmáticas (alguns paralelos às membranas) (Figura 5M) e eventuais retículos endoplasmáticos com camadas concêntricas (Figura 5N); alguns complexos de Golgi visíveis; citoplasma denso com ribossomos isolados e agrupados (Figura 5L-N); vesículas eletrodensas partindo da membrana plasmática para apoplasto (Figura 5O) e poucos plasmodesmos evidentes (Figura 5Q).

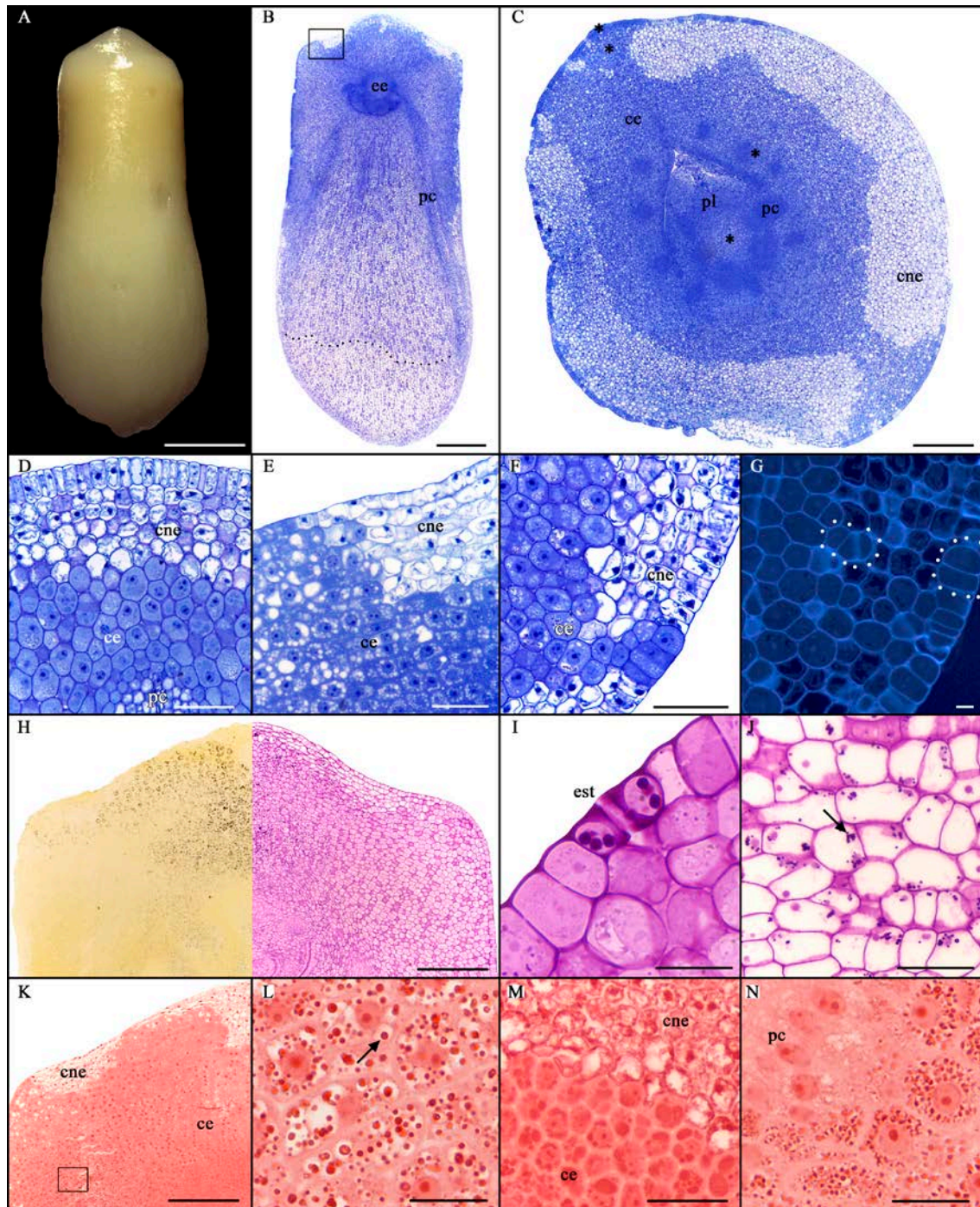


Figura 4. Embrião zigótico de gueroba (*Syagrus oleracea*) aos 7 dias em meio de indução de embriogênese somática (13,57 μM de 2,4-D). A: Embrião zigótico com leve intumescimento. B: Secção anatômica longitudinal do embrião zigótico mencionado na letra A; notar limite (linha pontilhada) entre células embriogênicas e não embriogênicas. C: Secção transversal de embrião zigótico com leve intumescimento; notar áreas reativas (*). D-F: Áreas reativas (com células embriogênicas). G: Células embriogênicas coradas com Calcoflúor White com divisões em diferentes planos. H: Grãos de amido corados com Lugol e *Periodic Acid Schiff* (PAS), respectivamente, localizados acima do promeristema radicular. I: Células-guardas com grãos de amido. J: Grãos de amido corados com PAS observados na região haustorial. K-M: Corpos proteicos corados com *Xylidine Ponceau* (XP) localizados nas proximidades do eixo embrionário. N: Corpos

proteicos corados com XP localizados nas proximidades do procâmbio. Abreviações: (ce) célula embriogênica, (cne) célula não embriogênica, (ee) eixo embrionário, (est) estômato, (pc) procâmbio e (pl) plúmula. Barras = A: 2 mm; B: 500 μ M; C, H, K: 200 μ M; D-F, N: 50 μ M; I, J, L, M: 20 μ M e G: 10 μ M.

Em termos de compostos de reserva, diferenças foram evidentes entre as células embriogênicas e as não embriogênicas. As células não embriogênicas exibiam eventuais amiloplastos nas mesmas regiões notificadas no tempo 0, conforme reagentes Lugol e PAS (Figuras 4I, 6H) e análises por MET (Figuras 5E, F e 6J, K). De acordo com reagente XP (Figura 4M, 6I) e análises via MET (Figuras 5A-F, H e 6J-L), essas células apresentavam declínio das reservas proteicas caracterizado pelo aumento da floculação dos corpos proteicos e a consequente formação de vacúolos. Eventuais gotas eletrodensas de natureza desconhecida também foram visualizadas (Figura 5G). Ainda conforme MET, foi possível observar corpos lipídicos, porém, em menor quantidade na maioria das células (Figuras 5A-I e 6L) e alguns com dimensões maiores (Figura 5C) que aqueles observados em células de embriões zigóticos não inoculados. Esses corpos lipídicos foram visualizados, principalmente, ao redor dos núcleos e membranas plasmáticas (Figuras 5A, C, G-I e 6L) e alguns aleatoriamente dispersos no citoplasma (Figura 5D). Em algumas células, notou-se que as três reservas supracitadas se encontravam muito próximas, formando ilhas no citoplasma pouco ativo (Figura 5E, F).

Já as células embriogênicas localizados em regiões específicas (imediatamente acima e abaixo do eixo embrionário e em algumas áreas protodérmicas) (Figura 4H, J) apresentavam amiloplastos conspicuos (Figura 6N). Algumas células embriogênicas da região distal não exibiam grãos de amido, outras exibiam em menor quantidade que o observado em células embriogênicas da região proximal. Ou seja, nem toda célula considerada embriogênica possuía amido. De acordo com MET, esses amiloplastos são bem definidos, ricos em grãos de amido e com membranas bem evidentes separando-os e são distribuídos sem um padrão específico no citoplasma (Figuras 5J, P e 6P-R). Observou-se também vesiculação ao lado dos amiloplastos, além de padrões repetitivos no formato dos amiloplastos (Figuras 5J, P e 6P-R). Corpos proteicos numerosos e com diferentes tamanhos também foram observados somente em algumas células embriogênicas localizadas nas laterais do eixo embrionário (Figura 4L) e dos feixes procambiais (Figura 4N). Além do mais, as células reativas das regiões proximal e mediana apresentaram-se fortemente coradas com XP (Figura 6O), enquanto que aquelas localizadas mais distalmente exibiam apenas resquícios proteicos (nas bordas de

vacúolos), ou seja, foi observado um gradiente proteico (maior para menor) no sentido região proximal – distal. Portanto, nem toda célula considerada embriogênica exibiu conteúdo proteico conspícuo. Reservas lipídicas não foram observadas conforme análises por MET.

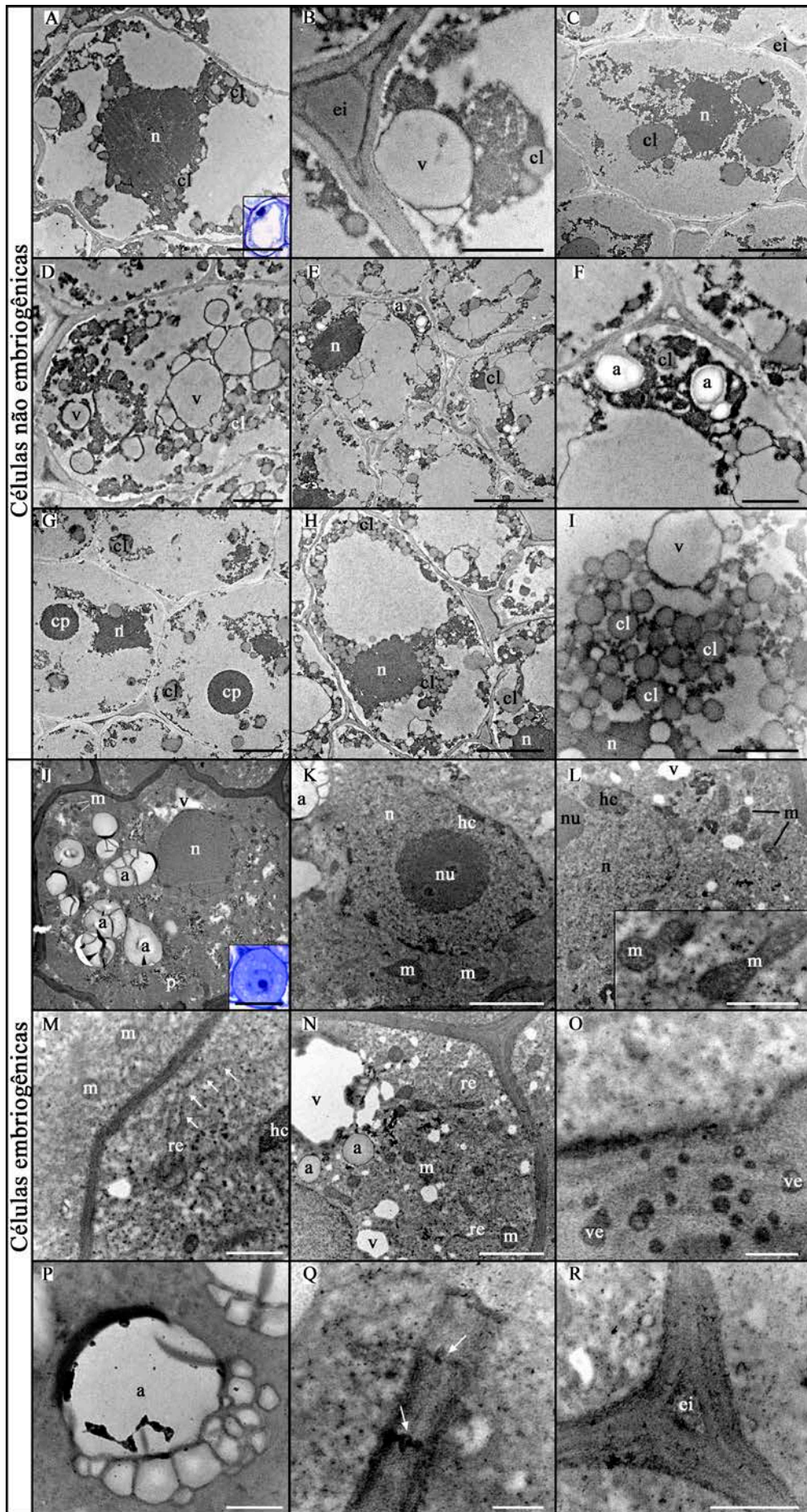


Figura 5. Caracterização ultraestrutural de células não embriogênicas e células embriogênicas de gueroba (*Syagrus oleracea*) aos 7 dias em meio de indução da embriogênese somática (13,57 μ M de 2,4-D). A: Ultraestrutura de célula não embriogênica do meristema fundamental aos 7 dias em meio de indução; notar citoplasma pouco denso, ausência de nucléolo e caracterização anatômica (quadrado lateral). B: Detalhe da letra A com vacúolo, corpos lipídicos e espaço intercelular evidentes. C: Célula não embriogênica com corpos lipídicos. D: Célula não embriogênica com vacúolos de tamanhos variados e corpos lipídicos. E: Células não embriogênicas com grãos de amido. F: Detalhe da letra E evidenciando reservas polissacarídicas e lipídicas. G: Células não embriogênicas com gotas eletrodensas de natureza desconhecida (seta). H: Célula não embriogênica com corpos lipídicos distribuídos nas proximidades do envelope nuclear e das membranas plasmáticas. I: Detalhe de corpos lipídicos. J: Ultraestrutura de célula embriogênica do meristema fundamental (região proximal) aos 7 dias em meio de indução; notar citoplasma denso, parede celular espessa e caracterização anatômica (quadrado lateral). K: Detalhe de núcleo com membrana irregular, nucléolo evidente e domínios de heterocromatina na periferia do envelope nuclear. L: Célula embriogênica com citoplasma rico em mitocôndrias. M: Detalhe de retículo endoplasmático (setas) e complexo de Golgi. N: Célula embriogênica com citoplasma rico em organelas (mitocôndrias e retículos endoplasmáticos); notar retículo endoplasmático concêntrico (quadrado). O: Detalhe de vesículas eletrodensas partindo da membrana plasmática para apoplasto. P: Detalhe de amiloplasto. Q: Detalhe de plasmodesmos (setas). R: Detalhe de espaço intercelular. Abreviações: (a) amido, (cl) corpo lipídico, (cg) complexo de Golgi, (ei) espaço intercelular, (hc) heterocromatina, (m) mitocôndria, (n) núcleo, (nu) nucléolo, p (proteína), (re) retículo endoplasmático, (v) vacúolo e (ve) vesícula. Barras = C, E, G, H, J: 2 μ m; A, D, K, L, N: 1 μ m; B, F, I, M, P, R: 0,5 μ m e O, Q: 0,2 μ m.

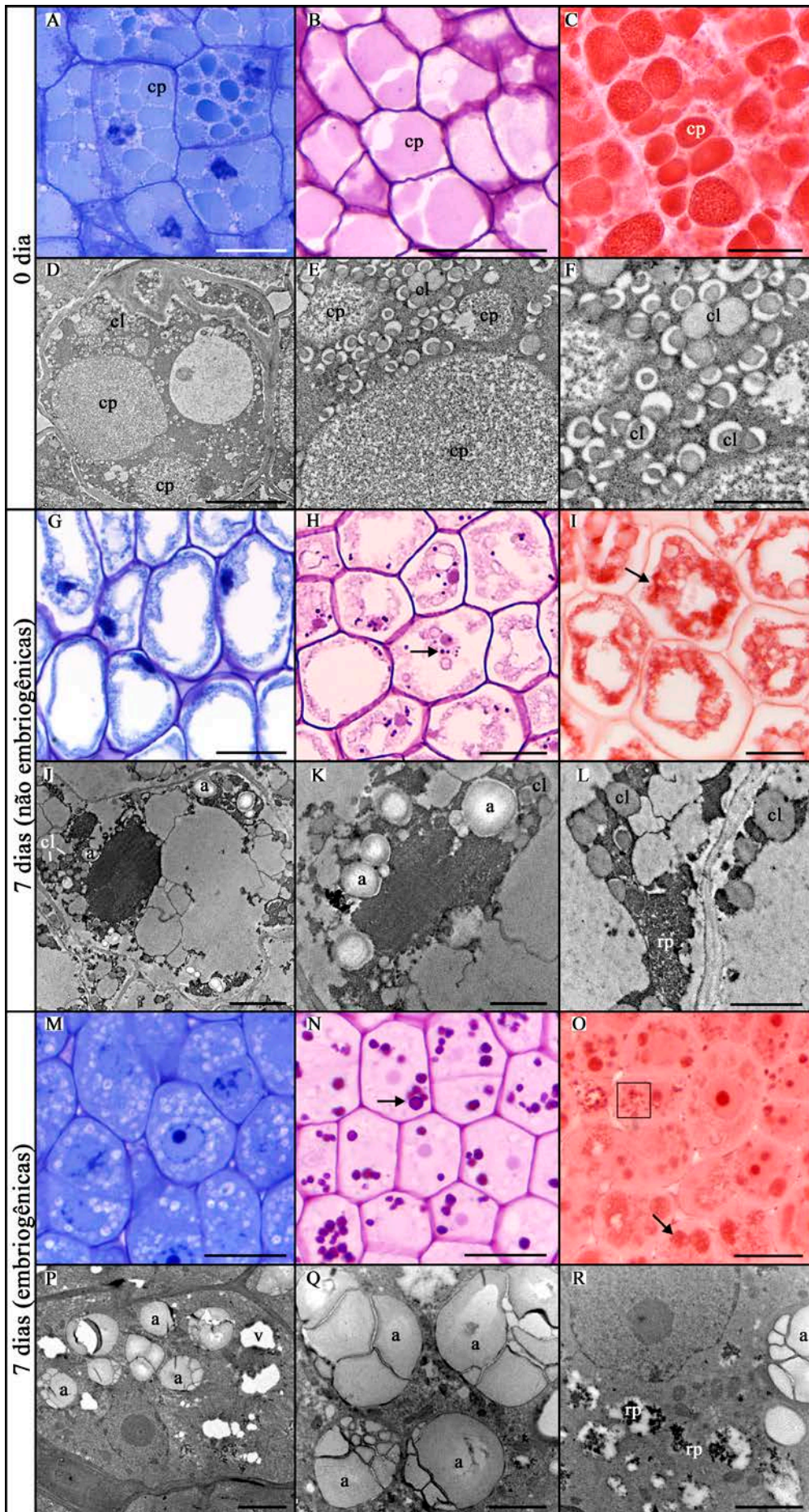


Figura 4. Caracterização anatômica, histoquímica e ultraestrutural de células de embriões zigóticos de gueroba (*Syagrus oleracea*) no tempo 0 (não inoculados) e aos 7 dias em meio de indução de embriogênese somática (13,57 μM de 2,4-D), com ênfase nos compostos de reserva. A: Secção anatômica de célula do meristema fundamental de embrião zigótico não inoculado. B: Célula do meristema fundamental (região distal) de embrião zigótico não inoculado corada com *Periodic Acid Schiff* (PAS), sem grãos de amido evidentes. C: Célula do meristema fundamental de embrião zigótico não inoculado, com corpos proteicos conspícuos corados com *Xylidine Ponceau* (XP). D: Ultraestrutura de célula do meristema fundamental de embrião zigótico não inoculado com reservas proteicas e lipídicas. E: Detalhe da letra D evidenciando corpos proteicos floculentos e corpos lipídicos. F: Detalhe da letra D e E evidenciando corpos lipídicos. G: Secção anatômica de célula não reativa (não embriogênica) do meristema fundamental aos 7 dias em meio de indução. H: Grãos de amido (seta) em células não reativas do meristema fundamental (região distal) aos 7 dias em meio de indução. I: Resquícios de proteína (seta) em células não reativas do meristema fundamental aos 7 dias em meio de indução. J: Ultraestrutura de célula não reativa do meristema fundamental aos 7 dias em meio de indução; notar citoplasma pouco denso. K: Detalhe da letra J evidenciando grãos de amido ao redor do núcleo. L: Detalhe da letra J evidenciando resquícios proteicos e corpos lipídicos. M: Secção anatômica de célula reativa (embriogênica) do meristema fundamental (região proximal) aos 7 dias em meio de indução. N: Grãos de amido (seta) em células reativas do meristema fundamental aos 7 dias em meio de indução. O: Corpos proteicos definidos (seta) e resquícios proteicos (quadrado) em células reativas do meristema fundamental (região proximal) aos 7 dias em meio de indução. P: Ultraestrutura de célula reativa do meristema fundamental aos 7 dias em meio de indução; notar citoplasma denso com pequenos vacúolos. Q: Detalhe da letra P evidenciando grãos de amido. R: Detalhe da letra Q evidenciando vacúolos com proteína. Abreviações: (a) amido, (cl) corpo lipídico, (cp) corpo proteico, (p) proteína, (rp) resquício proteico e (v) vacúolo. Barras = B: 50 μM ; G, H, M: 25 μM ; A, C, I, N, O: 20 μM ; D, P: 2 μM ; J, Q, R: 1 μM e E, F, K, L: 0,5 μM .

14 dias

Aos 14 dias em meio de indução, observou-se na maioria dos embriões zigóticos a formação de nódulos pequenos, compactos e translúcidos sobre toda a região distal, exceto nas áreas em contato direto com o meio de cultura (Figura 7A).

Em termos anatômicos, quase toda a protoderme reagiu, sendo formada basicamente por células embriogênicas (Figura 7B, C). Células subprotodérmicas em divisão celular também foram observadas (Figura 7C). A vacuolação e o tamanho dos vacúolos aumentaram gradualmente das células subprotodérmicas às camadas celulares internas do meristema fundamental (Figura 7B), onde ocorriam células com grandes vacúolos, algumas nitidamente agrupadas por uma parede celular mais espessa (Figura 7K, L), o que caracteriza proembriões. Não foi constatado o desenvolvimento do eixo embrionário e nem dos promeristemas (Figura 7D). Partindo das adjacências do eixo embrionário (Figura 7B, D, E) e dos cordões procambiais (Figura 7B) e em diferentes direções, observou-se um conjunto de células embriogênicas em intensa divisão celular, dividindo-se predominantemente em sentido periclinal (evidenciado por corante Calcoflúor White), o que resultou na formação de fileiras, nitidamente comprimindo as células que não reagiram (Figura 7F, G). O reagente Azul de Anilina evidenciou calose em algumas células embriogênicas partindo do eixo embrionário (Figura 7F), o mesmo não constatado nas fileiras periclinais (Figura 7H).

Foram observadas células em intensa atividade mitótica nas proximidades dos elementos vasculares, com diferentes planos de divisão (Figura 7M, N).

A região distal foi caracterizada por evidentes protuberâncias (invaginações) consequentes de divisões celulares da protoderme e sobretudo da subprotoderme (Figuras 7B, I, J e 8C). Essas protuberâncias foram morfológicamente caracterizadas como nódulos pequenos, compactos e translúcidos (Figura 7A). As células dentro das protuberâncias apresentavam citoplasma intensamente corado, com núcleos em intensa divisão celular (diferentes fases da mitose), sobretudo, periclinais, embora outros padrões tenham sido observados por coloração com Calcoflúor White (Figura 7J). Essas células exibiam alta relação núcleo/citoplasma, núcleos grandes (diâmetro médio de 1,04 μm) com paredes irregulares e um ou dois nucléolos evidentes (diâmetro médio de 0,32 μm), paredes celulares delgadas (espessura média de 0,034 μm) (Tabela 1), vacúolos numerosos com diferentes tamanhos, citoplasma denso, rico em organelas como mitocôndrias de diferentes formatos, além de alguns amiloplastos com poucos grãos de amido. Na base das protuberâncias, verificou-se uma convergência entre as

células protodérmicas e subprotodérmicas em divisão e as células advindas das adjacências dos cordões procambiais também em intensa divisão celular, em diferentes planos de acordo com corante Calcoflúor White (Figura 7J). Uma parte significativa das protuberâncias era regada por células do procâmbio (inclusive, elementos de vasos diferenciados) (Figura 7J).

Nesse trabalho, achou-se conveniente distinguir células embriogênicas de células meristemáticas, apesar das semelhanças anatômicas, com base em características visualizadas por MET (Figura 8) e analisadas em conjunto, tais como: número de nucléolos, com células embriogênicas exibindo preferencialmente um nucléolo (Figura 8A, B) ao passo que meristemáticas apresentavam um, dois nucléolos (Figura 8C, D) ou nucléolos não definidos (Figura 8H); espaços intercelulares presentes somente em células embriogênicas (exceto em células embriogênicas protodérmicas) (Figura 4R, 8B); células embriogênicas com paredes celulares espessas (espessura média de 0,27 μm), diferentemente das células meristemáticas (espessura média de 0,034 μm) (Figuras 8B e 8D, G; Tabela 1), quantidade e formato de amiloplastos e quantidade de grãos de amido, de modo que as embriogênicas exibiam geralmente (a depender da localização) grandes amiloplastos ricos em grãos de amido e com formatos similares (Figura 8B), enquanto que as meristemáticas apresentavam poucos amiloplastos, desprovidos de grãos de amido ou com poucos grãos (Figura 8H, K). Portanto, as células das protuberâncias foram aqui classificadas como meristemáticas, conforme distinção supracitada.

Na extremidade mais distal (no centro) dos embriões zigóticos foram visíveis grupos de células isoladas por paredes celulares mais espessas e com espaços intercelulares proeminentes, caracterizados como proembriões, provenientes de divisões mitóticas de células embriogênicas (Figura 8F), porém com um grau de vacuolação menor que o observado naqueles proembriões localizados na base das protuberâncias (Figura 7K). As paredes celulares dessas estruturas não apresentaram reação positiva para calose por meio do corante Azul de Anilina e, conforme corante Calcoflúor White, as células no seu interior não exibiam um padrão específico de divisão (Figura 7L). Segundo análises por MET, as células no interior dos proembriões exibiam além de vacúolos de tamanhos variáveis (Figura 8G), núcleos grandes com paredes irregulares, algumas com nucléolos proeminentes (um ou dois), outras sem nucléolos distinguíveis e com domínios irregulares de heterocromatina (Figura 8H). Além do mais, exibiam nitidamente paredes celulares externas mais espessas e paredes celulares internas

delgadas (Figura 8G), além de ausência de espaços entre as células do interior do proembrião. Essas células são metabolicamente muito ativas, em função da abundância de mitocôndrias com diferentes formatos (Figura 8I), ribossomos, assim como de retículos endoplasmáticos rugosos (Figura 8I, J). Plastídeos, a grande maioria desprovido de grãos de amido, também foram observados (Figura 8H, K). Tais características classificam as células do interior dos proembriões como meristemáticas. Plasmodesmos não foram observados nas paredes celulares externas dos proembriões.

Amiloplastos com grãos de amido foram observados em células reativas imediatamente acima do promeristema radicular (Figura 9A, B), ao redor do eixo embrionário (laterais e abaixo) (Figura 9A), nas laterais dos cordões procambiais, na protoderme reativa da região proximal, em alguns proembriões e nas áreas com intensa divisão celular, sobretudo, naquelas avançando em direção à protoderme (Figura 9C). Na região distal, algumas células apresentavam uma quantidade residual de amido. Já proteínas foram limitadas a resquícios (periferia dos vacúolos) em algumas poucas células embriogênicas localizadas na região proximal (Figura 9D), além da coloração mais intensa do citoplasma (Figura 9E). Pectinas foram identificadas nos espaços localizados entre os proembriões com corante Vermelho de Rutênio (Figura 9F).

Regiões do embrião zigótico mais próximas do meio de cultivo exibiram uma camada celular rica em compostos fenólicos entre as células consideradas embriogênicas e as células que não reagiram, essas últimas comprimidas e em degeneração (Figura 9G). Essa barreira fenólica foi identificada por meio dos corantes Azul de Toluidina, Dicromato de Potássio e Azul de Anilina que exibiram coloração esverdeada (Figura 9H), amarronzada (Figura 9I) e amarelo brilhante (Figura 9J), respectivamente.

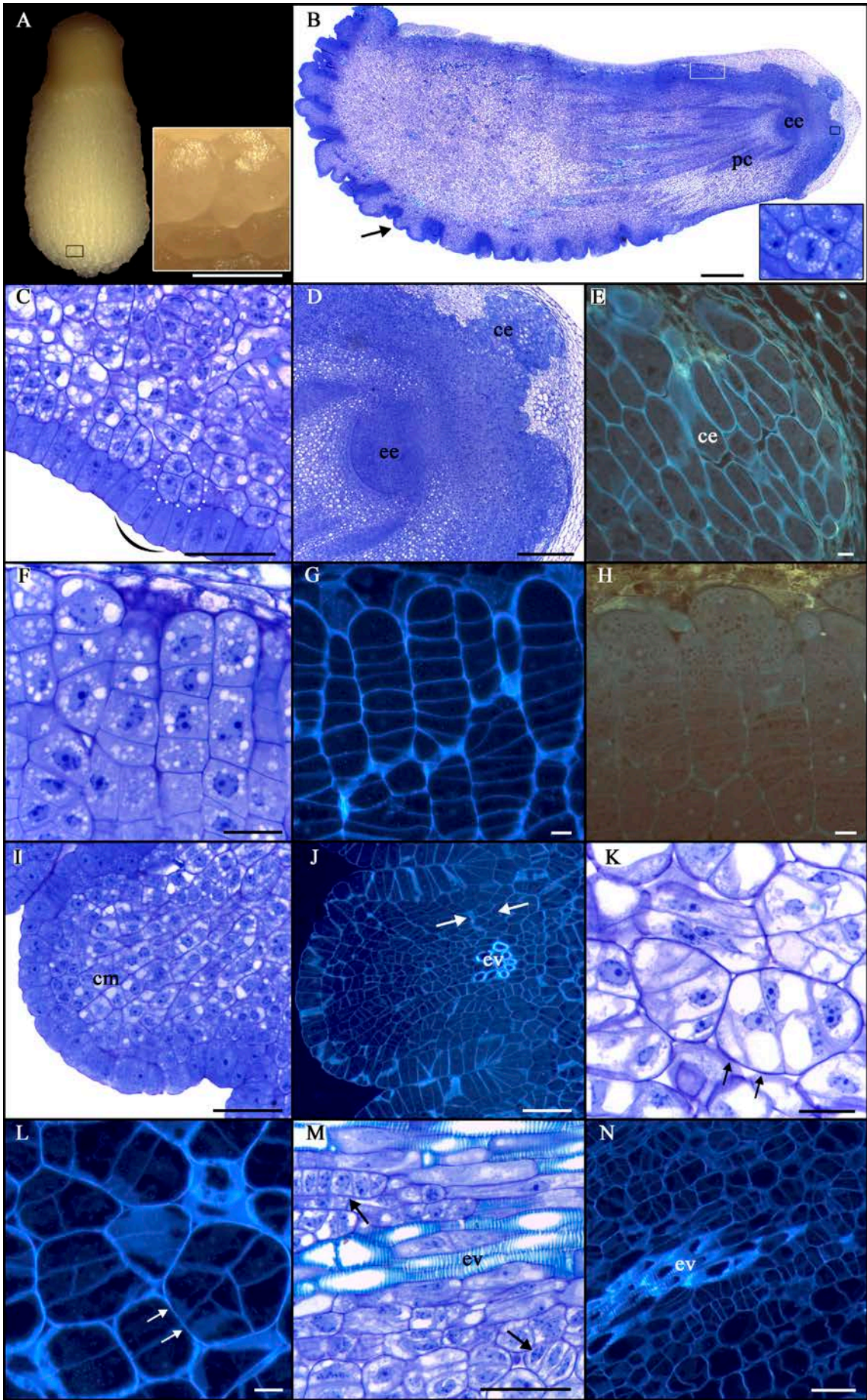


Figura 7. Embrião zigótico de gueroba (*Syagrus oleracea*) aos 14 dias em meio de indução de embriogênese somática (13,57 μ M de 2,4-D). A: Embrião zigótico com nódulos pequenos, compactos e translúcidos sobre a região distal (seta). B: Secção anatômica longitudinal do embrião zigótico mencionado na letra A; notar células em divisão celular (quadrado lateral correspondente ao quadrado com borda preta). C: Células protodérmicas e subprotodérmicas em divisão celular (início de protuberância). D: Magnificação da região proximal. E: Células embriogênicas com paredes celulares com calose identificada por corante Azul de Anilina. F: Células embriogênicas com padrão de divisão predominantemente em sentido periclinal; magnificação da região delimitada pelo retângulo com borda branca (letra B). G: Corante Calcoflúor White ratifica a ocorrência de divisões preferencialmente em sentido periclinal. H: Células embriogênicas com padrão de divisão predominantemente em sentido periclinal sem presença de calose (células coradas com Azul de Anilina). I: Magnificação de protuberância com células meristemáticas. J: Corante Calcoflúor White evidencia células de protuberância com divisões em diferentes planos. K: Proembriões; notar espessamento das paredes celulares externas (setas). L: Proembriões com células com divisões em diferentes planos, conforme Calcoflúor White; notar espessamento das paredes celulares externas (setas). M, N: Células em intensa atividade mitótica nas proximidades dos elementos vasculares, com diferentes planos de divisão (setas). Abreviações: (ce) célula embriogênica, (cm) célula meristemática, (ee) eixo embrionário, (ev) elemento de vaso e (pc) procâmbio. Barras = A: 2 mm; B: 500 μ M; C: 200 μ M; E, I, M: 50 μ M; F, J, K, N: 20 μ M e D, G, H, L: 10 μ M.

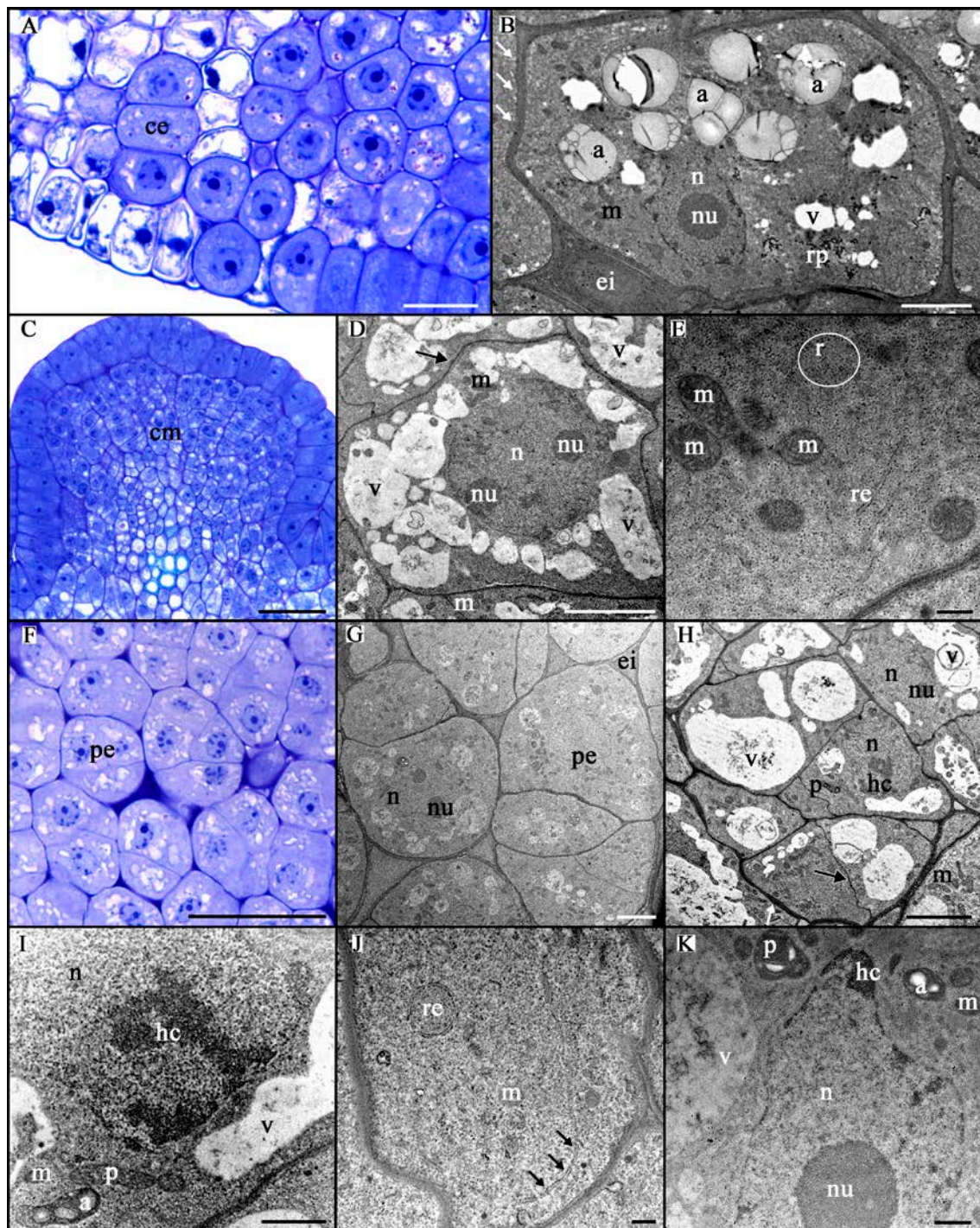


Figura 8. Caracterização anatômica e ultraestrutural de células embriogênicas, células meristemáticas (protuberâncias) e proembriões obtidos a partir de embriões zigóticos de gueroba (*Syagrus oleracea*) estes dois últimos observados aos 14 dias em meio de indução. A: Secção anatômica de células embriogênicas aos 7 dias em meio de indução de embriogênese somática (13,57 μ M de 2,4-D). B: Ultraestrutura de célula embriogênica aos 7 dias em meio de indução; notar citoplasma denso, núcleo central com formato irregular e nucléolo solitário, grãos de amido conspícuos, parede celular mais espessa (setas) e espaço intercelular proeminente. C: Secção anatômica de protuberância aos 14 dias em meio de indução de embriogênese somática (13,57 μ M de 2,4-D) com células meristemáticas. D: Ultraestrutura de célula meristemática localizada no interior de protuberância; observar citoplasma denso, núcleo central com dois

nucléolos, parede celular fina (seta) e ausência de espaços intercelulares. E: Citoplasma de célula meristemática com mitocôndrias, retículos endoplasmáticos e inúmeros ribossomos (círculo). F: Secção anatômica de proembriões aos 14 dias em meio de indução de embriogênese somática (13,57 μ M de 2,4-D) com células meristemáticas. G: Ultraestrutura de proembriões; notar espaços intercelulares. H: Ultraestrutura de proembrião; notar parede celular externa mais espessa (seta branca) que as paredes celulares internas (seta preta). I: Célula meristemática observada no interior de proembrião com evidentes domínios de heterocromatina e plastídeos com poucos grãos de amido ou desprovidos deles. J: Célula meristemática observada no interior de proembrião, com citoplasma composto por mitocôndrias e retículos endoplasmáticos; observar retículo endoplasmático concêntrico. K: Plastídeos com poucos grãos de amido visualizados no interior de célula meristemática; notar núcleo com parede irregular. Abreviações: (a) amido, (ce) célula embriogênica, (cm) célula meristemática, (ei) espaço intercelular, (hc) heterocromatina, (m) mitocôndria, (n) núcleo, (nu) nucléolo, (p) plastídeo, (pe) proembrião, (r) ribossomo, (re) retículo endoplasmático, (rp) resquício proteico e (v) vacúolo. Barras = C: 50 μ M; A, F: 20 μ M; G: 5 μ M; B, D: 2 μ M; K: 1 μ M e E, H-J: 0,5 μ M.

Tabela 1. Diâmetro de núcleos e nucléolos e espessura de paredes celulares de células do embrião zigótico no tempo inicial (tempo 0 dias), células não embriogênicas e embriogênicas (7 dias de cultivo) e células meristemáticas de protuberâncias (14 dias de cultivo)

Células	Diâmetro do núcleo (μ m)	Diâmetro do nucléolo (μ m)	Espessura da parede (μ m)
Células iniciais (tempo 0)	1,63 \pm 0,30	-	0,14 \pm 0,01
Células não embriogênicas (7 dias)	1,44 \pm 0,12	-	0,08 \pm 0,01
Células embriogênicas (7 dias)	3,47 \pm 0,43	1,17 \pm 0,19	0,27 \pm 0,07
Células meristemáticas (14 dias)	1,04 \pm 0,31	0,32 \pm 0,09	0,034 \pm 0,016

Os valores citados referem-se à média \pm erro padrão.

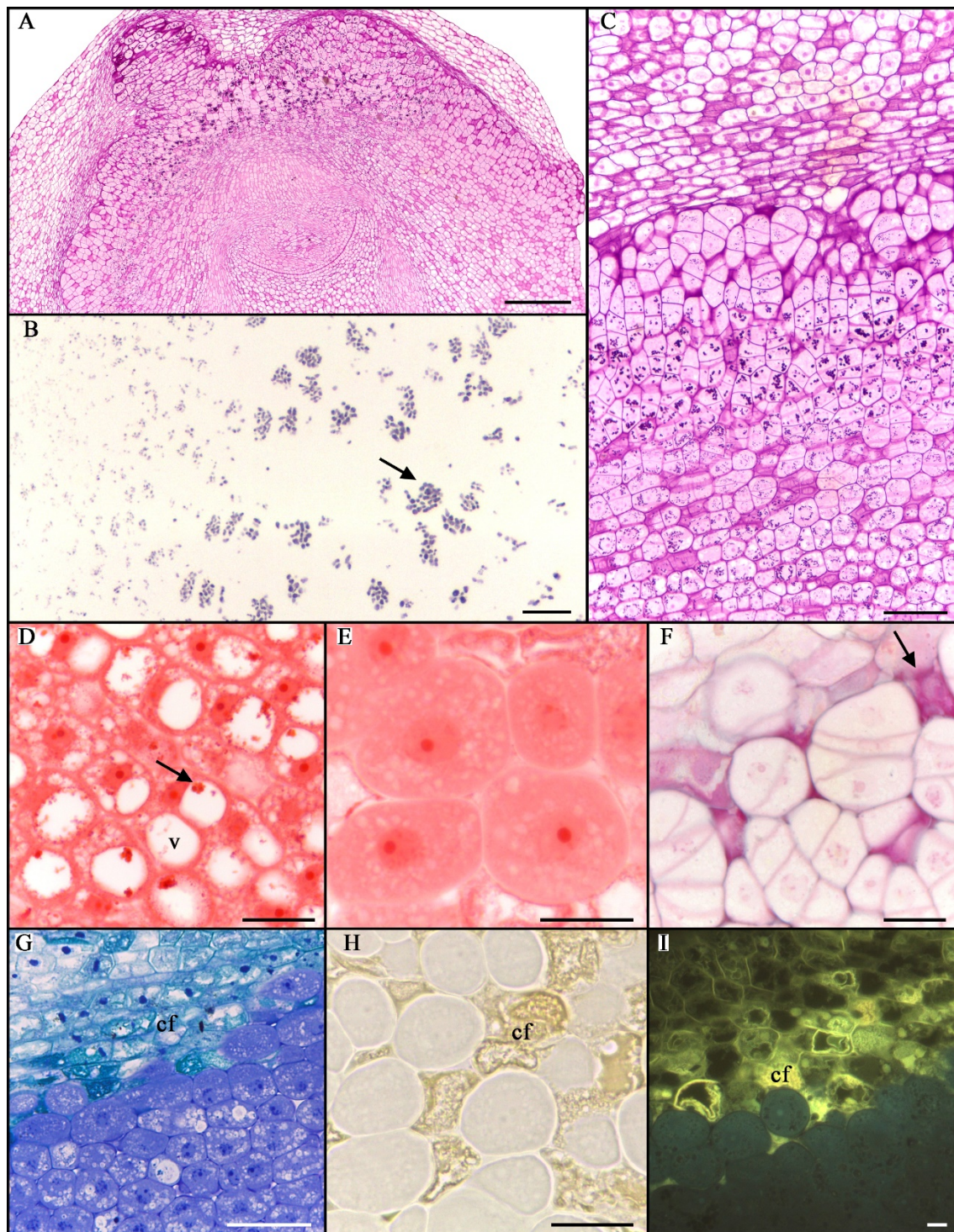


Figura 5. Caracterização histoquímica de embrião zigótico de guero (*Syagrus oleracea*) aos 14 dias em meio de indução de embriogênese somática (13,57 μ M de 2,4-D). A: Grãos de amido (corados com *Periodic Acid Schiff* - PAS) observados em células reativas localizadas imediatamente acima do promeristema radicular e ao redor do eixo embrionário. B: Grãos de amido (corados com Lugol) observados em células reativas localizadas imediatamente acima do promeristema radicular. C: Grãos de amido observados em área em intensa divisão celular. D: Células embriogênicas localizadas na região proximal com resquícios proteicos corados com *Xylidine Ponceau* (XP). E: Células embriogênicas com citoplasma denso, intensamente coradas com XP. F:

Pectinas identificadas nos espaços localizados entre os proembriões, com corante Vermelho de Rutênio (seta). G-I: Barreira fenólica identificada pelos corantes Azul de Toluidina, Dicromato de Potássio e Azul de Anilina, respectivamente, entre células embriogênicas e não embriogênicas. Abreviações: (cf) composto fenólico e (v) vacúolo. Barras = A: 200 μ M; B, G: 50 μ M; C-F, H: 20 μ M e I: 10 μ M.

21 dias

As alterações morfológicas observadas aos 21 dias em meio de indução foram caracterizadas principalmente pelo surgimento de uma massa calogênica com textura mucilagínosa (aquosa, hidratada) sobre a extremidade proximal da maioria dos embriões zigóticos e pelo desenvolvimento (crescimento) das estruturas nodulares localizadas sobre a região distal e formadas já aos 14 dias (Figura 10A).

As análises histológicas não evidenciaram desenvolvimento do eixo embrionário (Figura 10B, C). Segundo as secções anatômicas, a região proximal foi caracterizada por um conjunto de células embriogênicas em intensa divisão celular em direção à protoderme (Figura 10B, D). O produto dessa intensa divisão celular promoveu o rompimento de pontos específicos da protoderme, o que ocasionou a liberação de algumas células com maior grau de vacuolação e espaços intercelulares evidentes (Figura 10D). Os cortes histológicos também evidenciaram o incremento do tamanho das protuberâncias, que se tornaram mais citoplasmaticamente densas (Figura 10E). Nítidos e numerosos proembriões foram observados nas proximidades dos cordões procambiais, alguns se desenvolvendo em direção à protoderme do embrião zigótico, indo ao encontro das células das protuberâncias ou ao encontro das células que não reagiram (Figura 10F, G). Uma barreira fenólica conspícua entre células embriogênicas e não embriogênicas também foi evidente conforme reações em Azul de Toluidina (Figura 10H, I), Dicromato de Potássio (Figura 10J) e Azul de Anilina (Figura 10K).

Ainda de acordo com as análises histoquímicas, amiloplastos ricos em grãos de amido foram observados em células vacuoladas localizadas na extremidade proximal (Figura 10L), imediatamente acima do promeristema radicular e nas áreas em intensa divisão celular (Figura 10M), enquanto que corpos proteicos foram escassos (resquícos) e limitados às proximidades do eixo embrionário (Figura 10N).

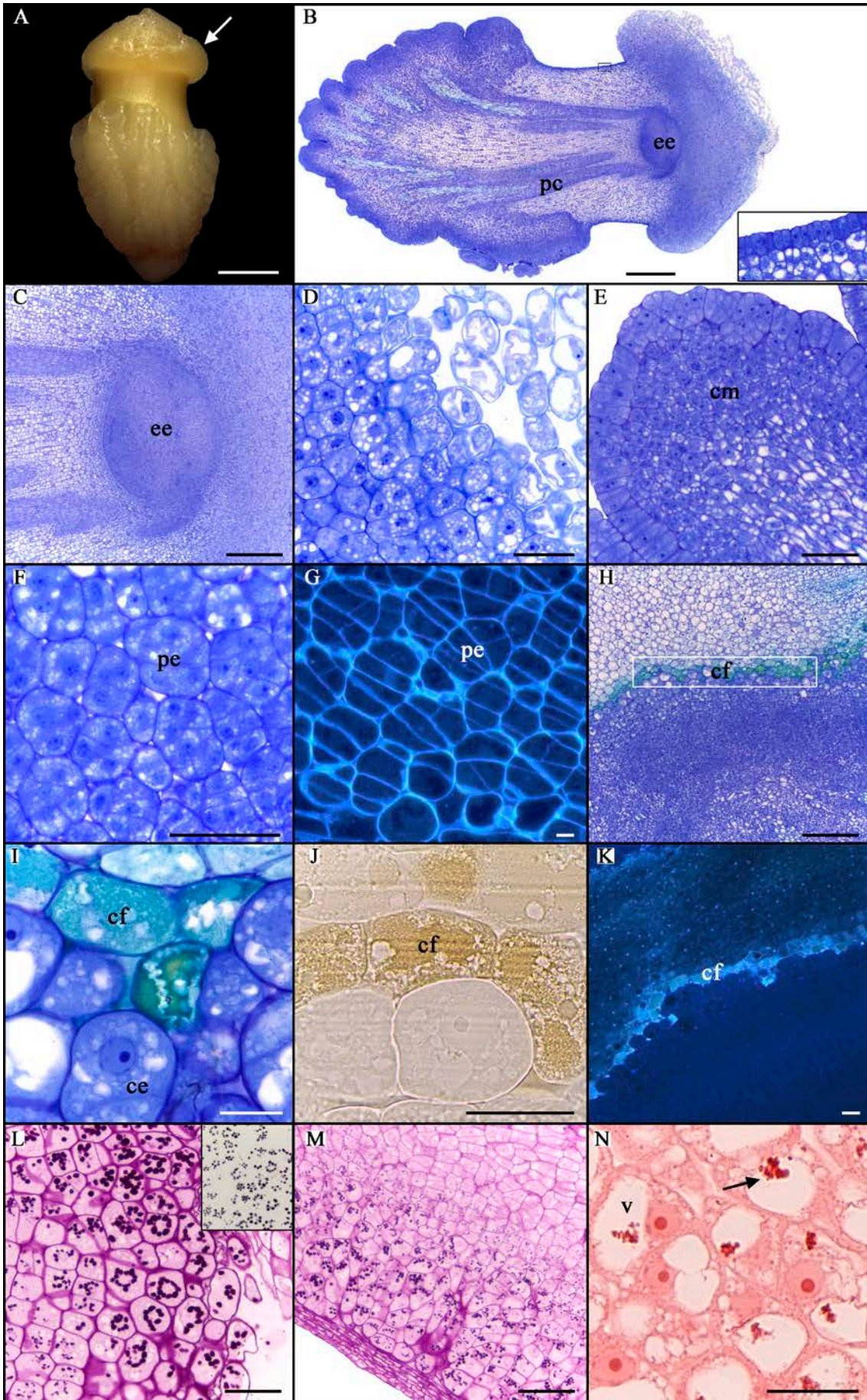


Figura 6. Embrião zigótico de gueroba (*Syagrus oleracea*) aos 21 dias em meio de indução de embriogênese somática (13,57 μ M de 2,4-D). A: Embrião zigótico com massa calogênica mucilagínosa sobre a extremidade proximal (seta) e desenvolvimento de estruturas nodulares localizadas sobre região distal. B: Secção anatômica longitudinal do embrião zigótico mencionado na letra A; notar protoderme reativa (retângulo lateral). C: Magnificação da região proximal. D: Células embriogênicas em intensa divisão celular localizadas na região proximal. E: Protuberância com células meristemáticas. F: Proembriões. G: Proembriões com células com divisões em diferentes planos, conforme Calcoflúor White. H-K: Barreira fenólica identificada pelos corantes Azul de Toluidina, Dicromato de Potássio e Azul de Anilina, respectivamente, entre células embriogênicas e não embriogênicas. L: Grãos de amido (corados com *Periodic Acid Schiff* - PAS) observados em células vacuoladas localizadas na extremidade proximal; grãos de amido corados com Lugol (quadrado lateral). M: Grãos de amido observados em área em intensa divisão celular. N: Células embriogênicas localizadas na região proximal com resquícios proteicos corados com *Xylidine Ponceau* (XP). Abreviações: (ce) célula embriogênica, (cf) composto fenólico, (cm) célula meristemática, (ee) eixo embrionário, (pc) procâmbio e (pe) proembrião. Barras = A: 2 mm; B: 500 μ M; C, H: 200 μ M; D, E, G, K, L, M: 50 μ M; J: 25 μ M; I, N: 20 μ M e F: 10 μ M.

30 dias

Os 30 dias em meio de indução foi marcado pelo desenvolvimento de estruturas nodulares maiores que aquelas usualmente visualizadas sobre a região distal, sobretudo, nas proximidades da região mediana do embrião zigótico (Figura 11A). Observou-se também incremento da massa calogênica da região proximal (Figura 11A).

Essas estruturas nodulares com maiores dimensões foram histologicamente caracterizadas como embriões somáticos de origem direta, em estágio globular, delimitados por protoderme e isolados do tecido de origem (ausência de conexão vascular) (Figura 11B-D). As características anatômicas observadas sugerem que as protuberâncias em crescimento também se tratavam de embriões somáticos de origem direta e multicelular (ampla área de ligação com o explante) (Figura 11B, E, F), o que é ratificado aos 60 dias de cultivo, quando se isolam completamente do explante inicial (Figura 12B).

Aos 30 dias, observaram-se também massas meristemáticas volumosas nas adjacências dos elementos de vaso (Figura 11G) e, semelhante ao já relatado nos dias anteriores, notaram-se proembriões (Figura 11H), alguns nitidamente comprimindo células não reativas, limitados por uma barreira fenólica (Figura 11H-J), com paredes celulares com calose (Figura 11J) e espaços intercelulares ricos em pectina. As análises histoquímicas evidenciaram amiloplastos ricos em grãos de amido nas células vacuoladas localizadas na extremidade proximal, nas células em alta divisão celular localizadas na região proximal (acima do promeristema radicular) (Figura 11K) e nas laterais dos feixes procambiais (Figura 11L). Corpos proteicos não foram observados (Figura 11M).

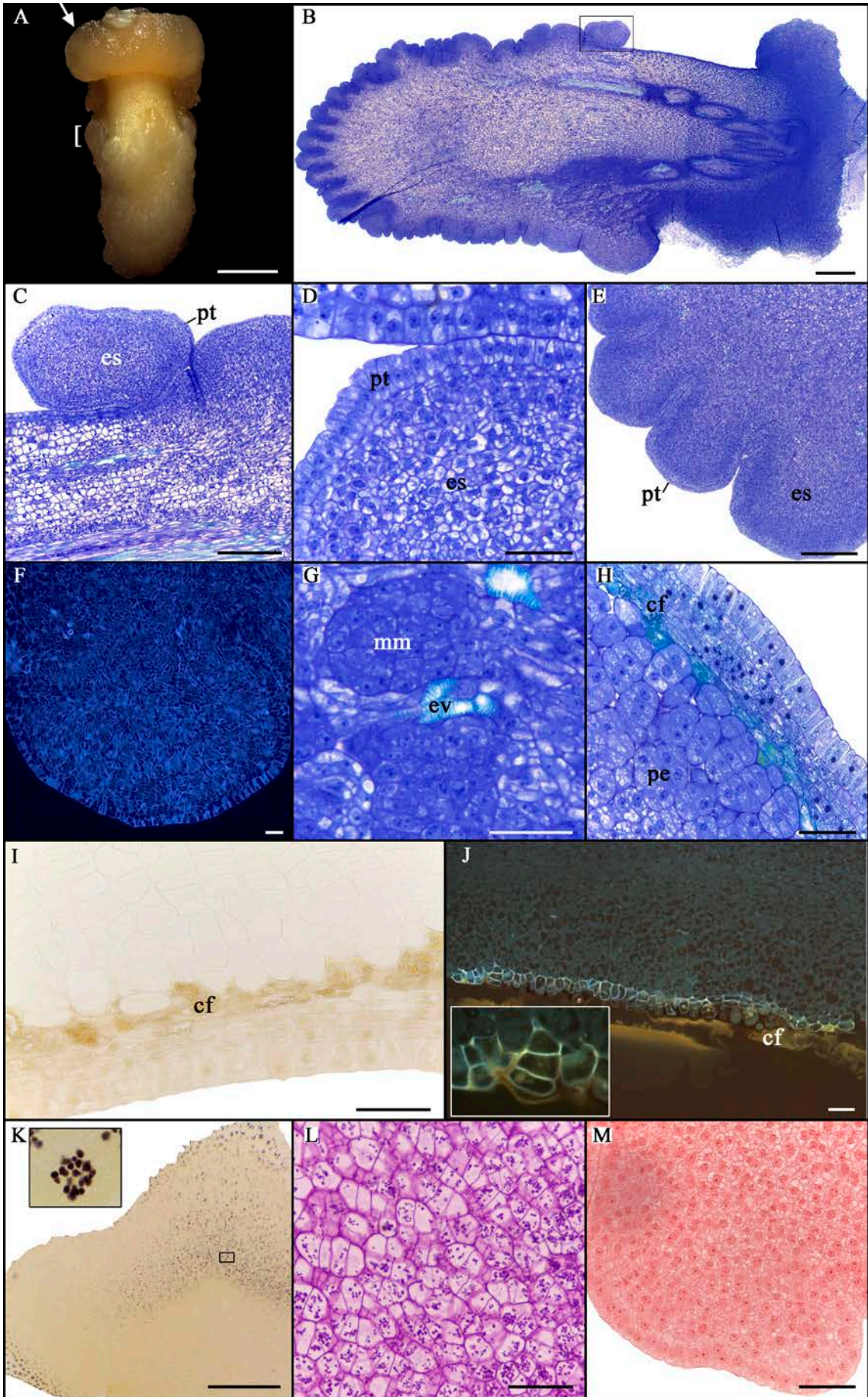


Figura 7. Embrião zigótico de gueroba (*Syagrus oleracea*) aos 30 dias em meio de indução de embriogênese somática (13,57 μ M de 2,4-D) e embriões somáticos originados a partir destes. A: Embrião zigótico com massa calogênica mucilaginosa sobre a extremidade proximal (seta) e embriões somáticos sobre as regiões mediana (colchete) e distal. B: Secção anatômica longitudinal do embrião zigótico mencionado na letra A; notar embrião somático com protoderme fechada (retângulo). C: Magnificação de embrião somático com protoderme fechada. D: Detalhe de protoderme do embrião somático mencionado anteriormente. E: Embriões somáticos de origem direta e multicelular. F: Embrião somático com células com divisões em diferentes planos (corado com Calcoflúor White). G: Massas meristemáticas volumosas nas adjacências dos elementos de vaso. H: Proembriões comprimindo células não reativas; observar barreira fenólica. I: Barreira fenólica identificada por Dicromato de Potássio entre células embriogênicas e não embriogênicas. J: Células embriogênicas e proembriões com paredes celulares com calose identificada por Azul de Anilina; notar barreira fenólica. K: Grãos de amido (corados com Lugol) localizados na extremidade proximal e acima do promeristema radicular. L: Grãos de amido (corados com *Periodic Acid Schiff* - PAS) localizados nas laterais dos feixes procambiais. N: Embrião somático desprovido de corpos proteicos conforme corante *Xylidine Ponceau* (XP). Abreviações: (cf) composto fenólico, (es) embrião somático, (mm) massa meristemática, (pe) proembrião e (pt) protoderme. Barras = A: 2 mm; B: 500 μ M; C, E: 200 μ M; D, G, H, J, L, M, N: 50 μ M e F, I: 20 μ M.

60 dias

Aos 60 dias, embriões somáticos globulares tornaram-se mais evidentes ao longo de toda a região mediana e distal (Figura 12A).

Anatomicamente os embriões somáticos exibiam protoderme diferenciada, alguns totalmente isolados do tecido materno, sem indícios de conexão vascular (Figura 12B, D). Conforme análises por MET, embriões somáticos observados aos 60 dias apresentavam células com grau de vacuolação variado, desde células com volumosos vacúolos (Figura 13A, B) até células com pouco ou nenhum vacúolo (Figura 13A, C). De modo geral, as células exibiam alta relação núcleo/citoplasma, núcleos conspícuos com fragmentos de heterocromatina dispersos (Figura 13B-D) e citoplasma rico em mitocôndrias com diferentes formatos (Figura 13D, E), retículos endoplasmáticos curtos (Figura 13D, E), complexos de Golgi (Figura 13F) e ribossomos livres ou agrupados (Figura 13D-F).

Observou-se também provável início de embriogênese secundária a partir da multiplicação de células protodérmicas de embriões somáticos primários (Figura 12C). Também foram observados proembriões avançando em direção à protoderme, alguns limitados por uma nítida barreira fenólica (Figura 12D-F) e com paredes celulares ricas em calose (Figura 12F).

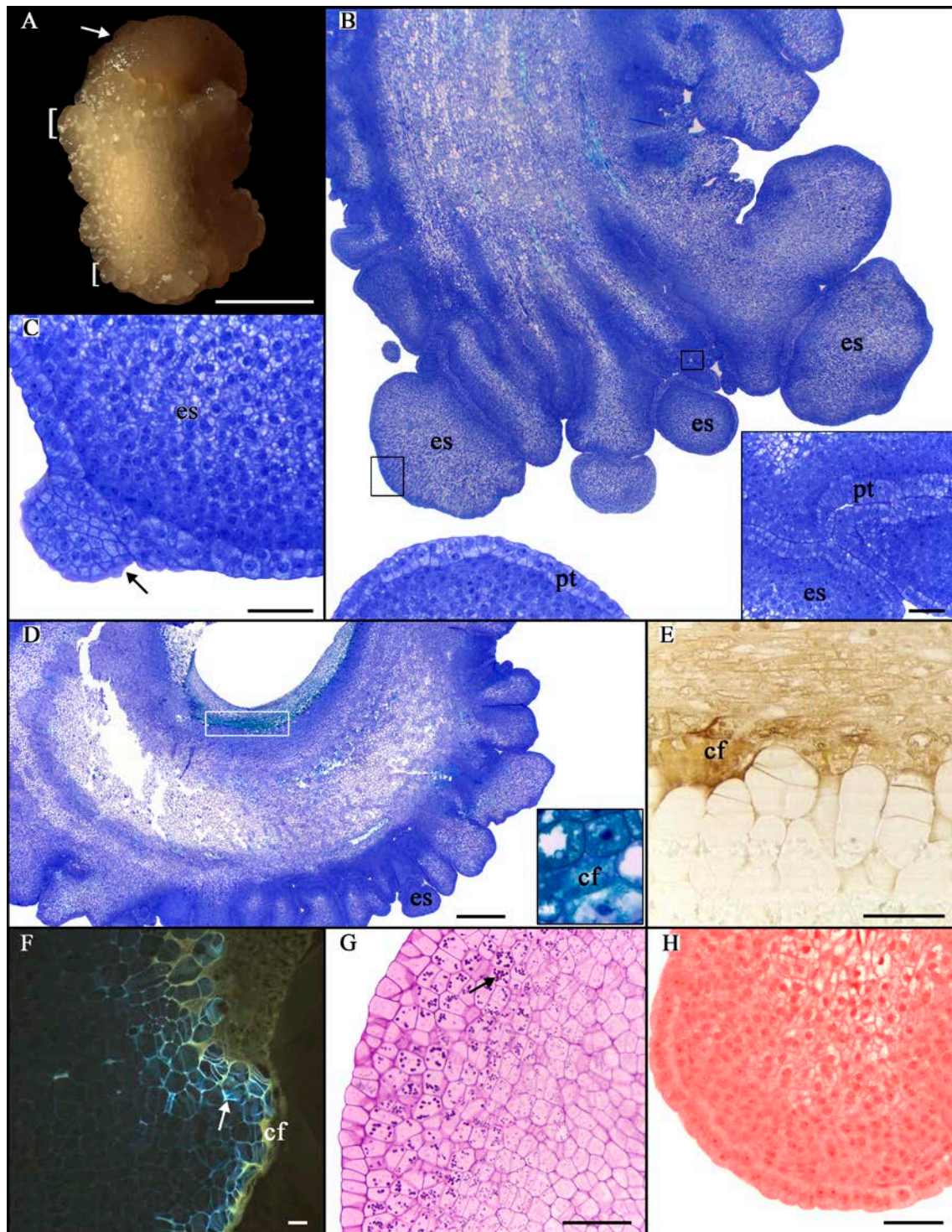


Figura 8. Embrião zigótico de guero (*Syagrus oleracea*) aos 60 dias em meio de indução de embriogênese somática (13,57 μM de 2,4-D) e embriões somáticos originados a partir destes. A: Embrião zigótico com massa calogênica mucilaginosa sobre a extremidade proximal (seta) e embriões somáticos sobre as regiões mediana e distal (colchetes). B: Secção anatômica longitudinal do embrião zigótico mencionado na letra A; notar embriões somáticos com protoderme fechada. C: Provável início de embriogênese secundária (seta). D, E: Barreira fenólica identificada por Azul de Toluidina e Dicromato de Potássio. F: Células embriogênicas e proembriões com paredes celulares com calose identificada por Azul de Anilina; notar barreira fenólica.

G: Grãos de amido (corados com *Periodic Acid Schiff* - PAS) visualizados em embrião somático. H: Embrião somático desprovido de corpos proteicos de acordo com *Xylidine Ponceau* (XP). Abreviações: (cf) composto fenólico, (es) embrião somático e (pt) protoderme. Barras = A: 1 mm; B, D: 500 μ M; C, E, G, H: 50 μ M e F: 20 μ M.

Segundo as análises histoquímicas, alguns embriões somáticos exibiam grãos de amido localizados em uma das suas extremidades (Figura 12G), enquanto que em outros, grãos de amido não foram identificados, o que é ratificado por análises por MET (Figura 13). Corpos proteicos não foram observados (Figura 12H). Gotas eletrodensas de natureza desconhecida, dispersas isoladamente no citoplasma, foram observadas em algumas células de embriões somáticos analisadas por MET (Figura 13E).

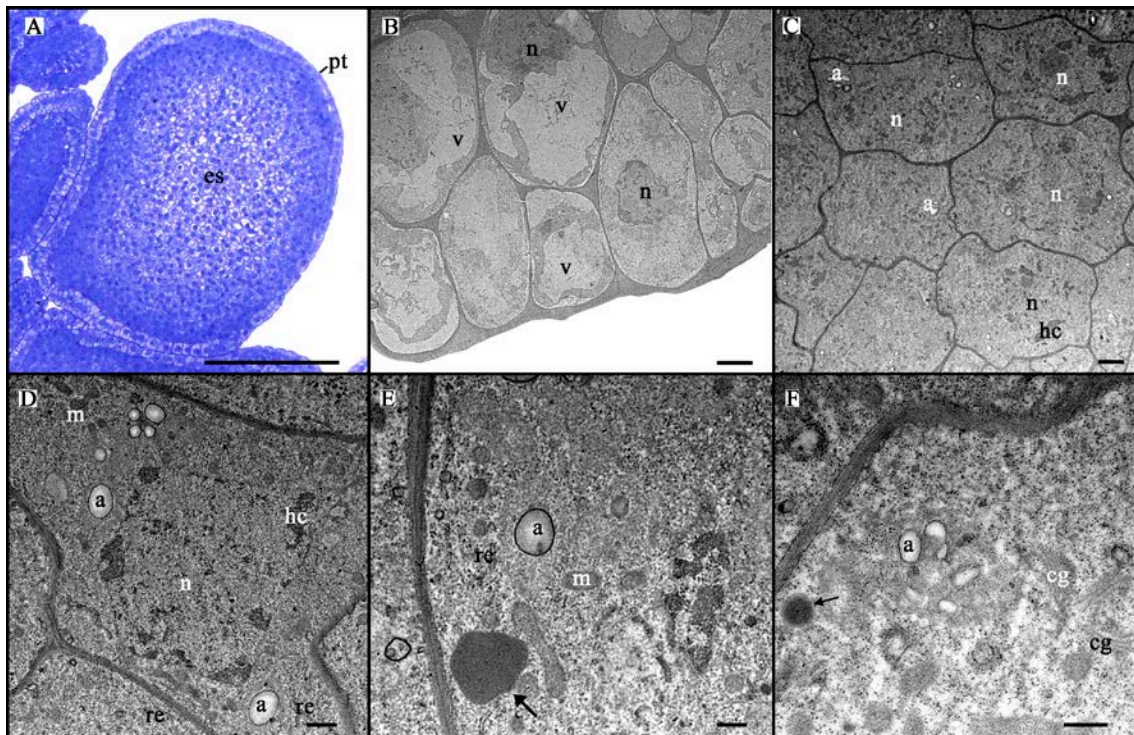


Figura 13. Caracterização anatômica e ultraestrutural de células de embriões somáticos globulares de guieira (*Syagrus oleracea*) obtidos a partir de embriões zigóticos após 60 dias em meio de indução de embriogênese somática (13,57 μ M de 2,4-D). A: Secção anatômica de embrião somático globular. B: Células vacuoladas localizadas na protoderme em formação. C: Células com citoplasmas densos; notar núcleos evidentes com fragmentos de heterocromatina. D: Detalhe de célula com alta relação núcleo/citoplasma; notar grãos de amido. E: Gota eletrodensa (seta) de natureza desconhecida. F: Detalhe de célula com complexos de Golgi evidentes, pequenos grãos de amido e gota eletrodensa de natureza desconhecida (seta). Abreviações: (a) amido, (cg) complexo de Golgi, (es) embrião somático, (hc) heterocromatina, (m) mitocôndria, (n) núcleo, (pt) protoderme, (re) retículo endoplasmático e (v) vacúolo. Barras = A: 500 μ m; B, C: 2 μ m; D: 1 μ m e E, D: 0,5 μ m.

90 dias

O padrão morfológico observado nas duas últimas avaliações, caracterizado pela presença de nódulos translúcidos (embriões somáticos) localizados sobre as regiões mediana e distal, foi desconfigurado, dada a formação acelerada de massas de calos sobre essas regiões (Figura 14A).

Anatomicamente, os 90 dias em meio com 2,4-D foi marcado pela perda do caráter embriogênico direto e pela desorganização celular. As secções anatômicas evidenciaram o rompimento de vários pontos da protoderme, com consequente liberação de massas calogênicas (Figura 14B). Observaram-se áreas internas intensamente coradas e áreas periféricas vacuoladas e com células dispersas (consistência mucilaginosa, aquosa, hidratada) (Figura 14B, C). As regiões protodérmicas, ainda íntegras, exibiam células embriogênicas (Figura 14D). Notaram-se também células embriogênicas partindo provavelmente dos feixes procambiais em direção à protoderme. Em alguns pontos essas células comprimiam áreas não reativas do embrião zigótico (Figura 14B, E), em outros pontos rompiam totalmente a protoderme (Figura 14B, F). Também foram observadas células embriogênicas isoladas, dispersas em meio a células que não reagiram e envolvidas por uma mucilagem corada de roxo em Azul de Toluidina (Figura 14G). Intensa vacuolação de possíveis proembriões também foi observada (Figura 14F), assim como embriões somáticos com provável origem unicelular (Figura 14H, I) e multicelular (Figura 14J, K).

As análises histoquímicas revelaram presença de amiloplastos com grãos de amido nas periferias de calos compostos predominantemente por células vacuoladas (Figura 14L, M) e corpos proteicos e/ou resquícios proteicos em algumas poucas células embriogênicas (Figura 14N).

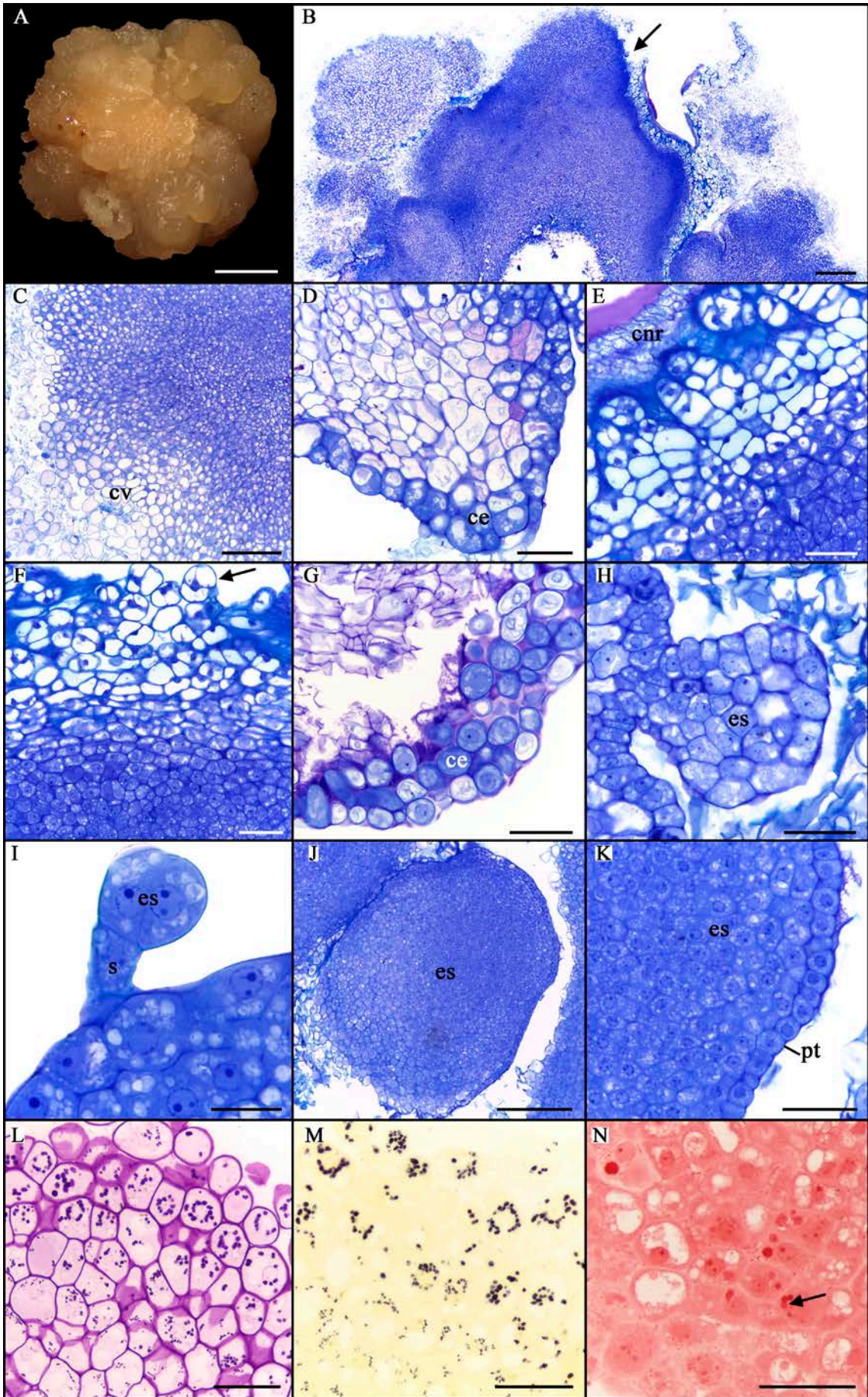


Figura 14. Embrião zigótico de gueroba (*Syagrus oleracea*) aos 90 dias em meio de indução de embriogênese somática (13,57 μ M de 2,4-D). A: Embrião zigótico envolto por calo. B: Secção anatômica longitudinal da região distal do embrião zigótico mencionado na letra A; notar rompimento de vários pontos da protoderme com consequente liberação de massas calogênicas (seta). C: Calo formado por células internas com citoplasma denso e células externas vacuoladas. D: Protoderme com células embriogênicas. E: Células não reativas do embrião zigótico sendo comprimidas. F: Protoderme rompida com liberação de possíveis proembriões com células vacuoladas (seta). G: Células embriogênicas isoladas. H, I: Embriões somáticos de provável origem unicelular. J: Embrião somático de provável origem multicelular. K: Detalhe da protoderme do embrião somático mencionado na letra J. L, M: Grãos de amido na periferia de calo composto predominantemente por células vacuoladas, corados com *Periodic Acid Schiff* (PAS) e Lugol, respectivamente. N: Células embriogênicas com corpos proteicos corados om *Xylidine Ponceau* (XP). Abreviações: (ce) célula embriogênica, (cnr) célula não reativa, (cv) células vacuoladas, (es) embrião somático, (mc) massa calogênica e (pt) protoderme. Barras = A: 2 mm; B: 500 μ M; J, K: 200 μ M; C-H, L-N: 50 μ M e I: 20 μ M.

120 dias

As alterações morfológicas observadas aos 120 dias foram marcadas, semelhante ao relatado aos 90 dias, por desconfiguração dos embriões somáticos na maioria dos explantes, conseqüente da formação de massas calogênicas sem formato definido, com bordas irregulares e consistência compacta (Figura 15A). Verificou-se também o crescimento de calos com consistência predominante mucilaginosa, principalmente, sobre as regiões mediana e proximal dos explantes (Figura 15A). Menciona-se que embriões zigóticos com alterações morfológicas quase imperceptíveis ou ausentes foram observados mesmo após 120 dias em meio de indução provido de auxina em alta concentração (Figura 16A).

De acordo com os cortes anatômicos, essas massas calogênicas eram formadas por células predominantemente embriogênicas (Figura 15B, C). Os arranjos protodérmicos no interior dos calos (Figura 15B) refletem a desconfiguração dos embriões somáticos de origem direta e multicelular, representados, conforme as análises anatômicas anteriores, por protuberâncias (invaginações da região distal que posteriormente se isolam do explante inicial) e morfológicamente por nódulos translúcidos e compactos. Algumas regiões protodérmicas apresentavam-se soltas, formando estruturas semelhantes a cordões, alguns altamente vacuolados (Figura 15D, E), outros formados por *clusters* de células embriogênicas (Figura 15D, F). Verificou-se alta vascularização (elementos de vaso visíveis), boa parte provenientes da própria região distal rica em células vasculares (Figura 15D). Células embriogênicas também foram observadas nas adjacências de alguns elementos de vaso.

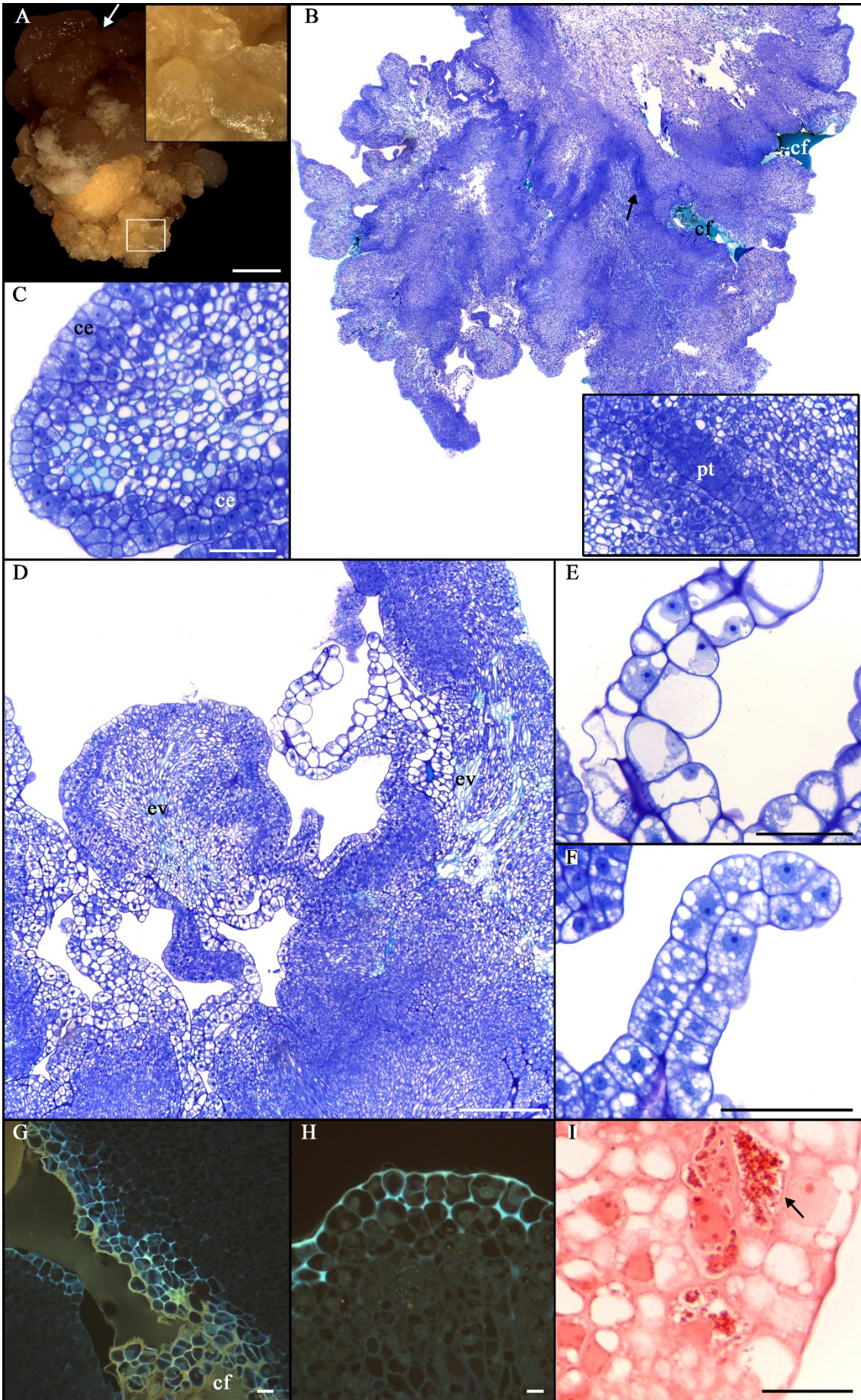


Figura 9. Embrião zigótico de gueroba (*Syagrus oleracea*) aos 120 dias em meio de indução de embriogênese somática (13,57 μ M de 2,4-D) com massa calogênica. A: Embrião zigótico com massa calogênica mucilaginosa sobre a região proximal (seta) e massa calogênica sem formato definido, com bordas irregulares e consistência compacta localizada na extremidade da região distal (retângulo). B: Secção anatômica longitudinal da extremidade da região distal do explante mencionado na letra A; notar arranjos protodérmicos (seta, retângulo lateral) e compostos fenólicos. C: Células embriogênicas observadas nas periferias dos calos. D: Regiões protodérmicas soltas, formando estruturas semelhantes a cordões; notar elementos de vaso. E: Regiões protodérmicas soltas com células vacuoladas. F: Regiões protodérmicas soltas com células embriogênicas. G: Calose observada em células localizadas nas proximidades de uma região rica em compostos fenólicos. H: Calose visualizada em células periféricas. I: Resquícios proteicos em células subprotodérmicas (seta) corados om *Xylidine Ponceau* (XP). Abreviações: (ce) célula embriogênica, (cf) composto fenólico, (ev) elemento de vaso e (pt) protoderme. Barras = A: 1 mm; B, D: 500 μ M; C, E, F: 50 μ M; G, H: 20 μ M e I: 10 μ M.

Calose evidente foi observada em células localizadas nas proximidades de uma região rica em compostos fenólicos (Figura 15G) e em células periféricas (Figura 15H). Conforme as análises histoquímicas, apenas proteínas (corpos proteicos e/ou resquícios proteicos) foram visualizados em algumas partes subprotodérmicas ativas (Figura 15I), em alguns *clusters* de células embriogênicas e em algumas células mais vacuoladas.

De acordo com as análises histoquímicas, embriões somáticos sem reação aos 120 dias de cultivo (Figura 16A-D) exibiram grãos de amido localizados sobre os primórdios foliares e imediatamente acima do eixo embrionário (Figura 16E, F) e resquícios de proteínas visualizados em algumas células da região distal (Figura 16G).

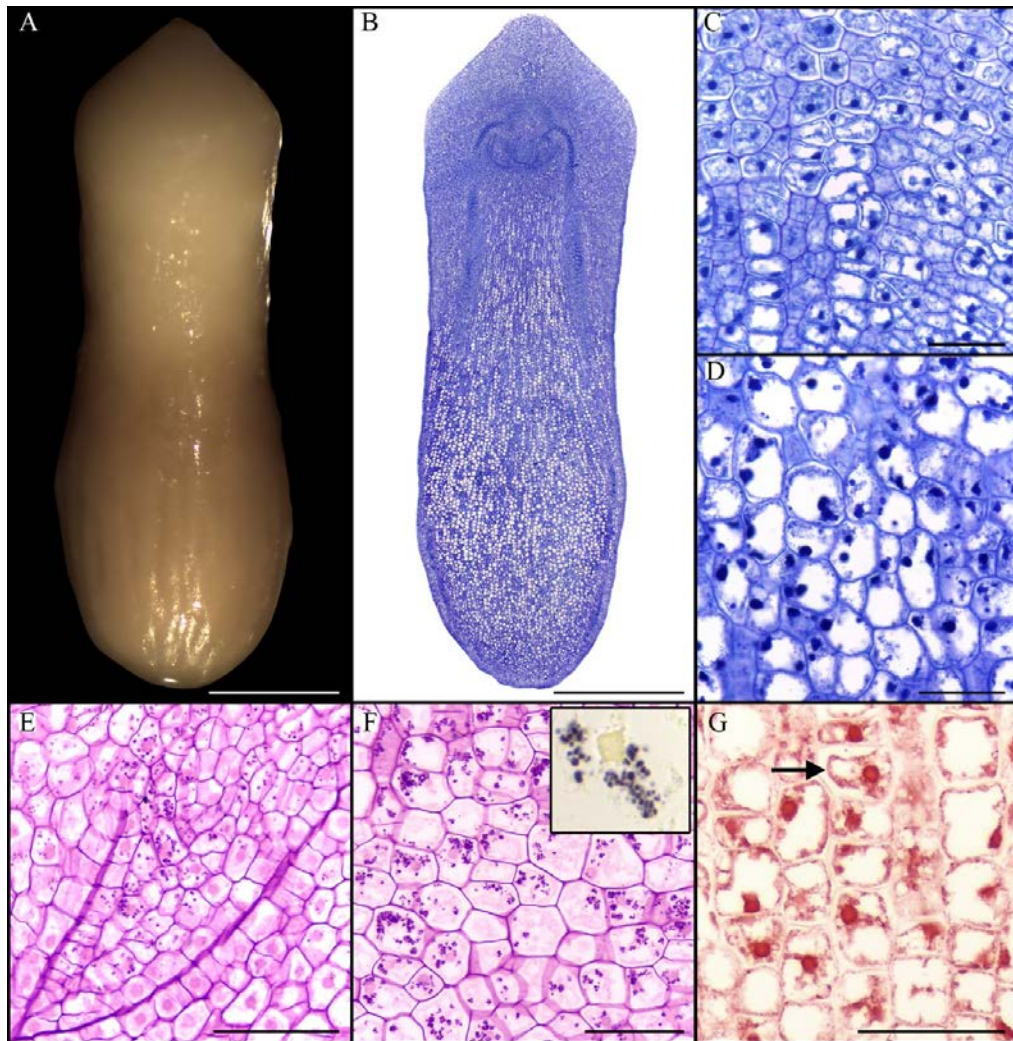


Figura 10. Embrião zigótico de guero (*Syagrus oleracea*) aos 120 dias em meio de indução de embriogênese somática ($13,57 \mu\text{M}$ de 2,4-D) sem reação. A: Aspecto morfológico de embrião zigótico sem reação. B: Secção anatômica longitudinal do embrião zigótico mencionado na letra A. C, D: Células não embriogênicas. E, F: Grãos de amido (corados com *Periodic Acid Schiff* - PAS) localizados sobre os primórdios foliares e imediatamente acima do eixo embrionário, respectivamente. G: Resquícios proteicos (corados com *Xylidine Ponceau* - XP) em células da região distal (seta). Barras = A: 1 mm; B: $500 \mu\text{M}$ e C-G: $50 \mu\text{M}$.

4. DISCUSSÃO

4.1 Caracterização anatômica

As palmeiras, de modo geral, assemelham-se morfológica e histologicamente entre si. Embriões zigóticos de *Syagrus oleracea*, por exemplo, apresentam um conjunto de características comuns a outras palmeiras, inclusive, de outros gêneros, tais como: eixo embrionário alinhado paralelamente ao comprimento do embrião, semelhante ao mencionado para *Phoenix dactylifera* (DEMASON; THOMSON, 1981) e *S. inajai* (GENOVESE-MARCOMINI; MENDONÇA; CARMELLO-GUERREIRO, 2013); radícula sem protoderme definida, como relatado em *Acrocomia aculeata* (RIBEIRO; OLIVEIRA; GARCIA, 2012), *S. inajai* (GENOVESE-MARCOMINI; MENDONÇA; CARMELLO-GUERREIRO, 2013), *Butia capitata* (MAGALHÃES *et al.*, 2013), *Attalea vitrivir* (NEVES *et al.*, 2013) e *Mauritia flexuosa* (SILVA *et al.*, 2014); presença de estômatos, similar ao mencionado para *A. aculeata* (RIBEIRO; OLIVEIRA; GARCIA, 2012), *S. inajai* (GENOVESE-MARCOMINI; MENDONÇA; CARMELLO-GUERREIRO, 2013) e *M. flexuosa* (SILVA *et al.*, 2014) e haustório com invaginações, como reportado em *A. aculeata* (RIBEIRO; OLIVEIRA; GARCIA, 2012) e *A. vitrivir* (NEVES *et al.*, 2013).

Embriões zigóticos se sobressaem como os explantes mais comumente utilizados para a iniciação da embriogênese somática em palmeiras (GUERRA; HANDRO, 1988, 1991, 1998; GOH *et al.*, 2001; LEDO *et al.*, 2002; STEINMACHER *et al.*, 2007; SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2012; BALZON; LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2013; LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2014; FREITAS *et al.*, 2016; SYUHADA; RASID; PARVEEZ, 2016; LUNA *et al.*, 2017), por apresentarem dentre outras vantagens, alta responsividade ao cultivo *in vitro*, provavelmente por possuírem muitos genes ainda ativos expressos durante a embriogênese zigótica ainda ativos (ISAH, 2016). Essa vantagem associadas à abundância de frutos em muitas espécies e à colheita pouco danosa a planta mãe (REE; GUERRA, 2015) projetam os embriões zigóticos como um excelente ponto de partida para estudos de embriogênese somática em uma determinada espécie de interesse.

Conforme análises das secções histológicas, sete dias de cultivo sob alta concentração de auxina foram suficientes para promover alterações anatômicas visíveis a nível celular, como incremento da relação núcleo/citoplasma, aumento do

metabolismo celular (citoplasma intensamente corado com Azul de Toluidina) e centralização dos núcleos (Figuras 5B-F e 6M), todas ratificadas a nível ultraestrutural (Figuras 4J-N, P e 6P-R). Essas alterações fornecem evidências de que células de embriões zigóticos de gueroaba são competentes às condições indutoras *in vitro*, sobretudo, aquelas células localizadas nas proximidades do eixo embrionário, nas adjacências dos cordões procambiais, na protoderme e subprotoderme do lado adaxial da região haustorial (sem contato direto com o meio de cultura). A pronta responsividade dessas células certamente está relacionada ao seu baixo grau de especialização e ao maior conteúdo de auxina endógena, fatores cruciais à competência embriogênica (FEHÉR; PASTERNAK; DUDITS, 2003; FEHÉR, 2006). O conjunto geral de características adquiridas as enquadram como células embriogênicas (MAHESWARAN; WILLIAMS, 1985; PLATA; BALLESTER; VIEITEZ, 1991; GUERRA; HANDRO, 1998; ZEGZOUTI; ARNOULD; FAVRE, 2001; KURCZYNSKA *et al.*, 2007; KURCZYNSKA *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2017; PILARSKA *et al.*, 2016), ou seja, capazes de formar embriões somáticos.

Segundo Williams e Maheswaran (1986), células embrionárias, como aquelas da protoderme de embriões zigóticos, e células epidérmicas de plântulas ou mudas são consideradas células pré-embriogênicas determinadas, o que explica os vários relatos da sua participação na embriogênese somática de diferentes espécies, como *Medicago sativa* (SANTOS; CUTTER; DAVEY, 1983), *Oryza sativa* (JONES; ROST, 1989), *Camellia reticulata* (PLATA; BALLESTER; VIEITEZ, 1991), híbridos de *Abies* (SALAJOVÁ; SALAJ, 2001) e *Euterpe oleracea* (SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2012). De acordo com Konar, Thomas e Street (1972) em *Ranunculus sceleratus*, células epidérmicas que exibem características embriogênicas representam células que não conseguiram se diferenciar e que mantiveram a capacidade de divisão e de originar embriões somáticos.

A alta eficácia embriogênica da auxina sintética 2,4-D, devido provavelmente ao duplo papel exercido por esse regulador, uma vez que, ao passo que se porta como uma auxina de alta mobilidade e de baixa acessibilidade metabólica da molécula livre (INGENSIEP, 1982), agindo de forma direta ou modificando o metabolismo intracelular de auxinas endógenas (FEHÉR; PASTERNAK; DUDITS, 2003; KIKUCHI *et al.*, 2006), o 2,4-D também se configura como um agente estressor (BHAT *et al.*, 2015; NIC-CAN; LOYOLA-VARGAS, 2016).

Multiplicação de células embriogênicas na região proximal, especificamente na área sobre o promeristema radicular, foi notada já aos 14 dias de cultivo (Figura 7), o que resultou em uma massa de calo mucilaginoso (hidratado, aquoso) observada aos 21 dias em meio de indução (Figura 10). É comum durante a germinação *in vitro* de palmeiras o desenvolvimento de uma zona conhecida como “M” (multisseriada) (HACCIUS; PHILIP, 1979; MAGALHÃES *et al.*, 2013) imediatamente acima do promeristema radicular, a qual estaria relacionada com a protusão do sistema radicular (MAGALHÃES *et al.*, 2013), ou ainda, com o deslocamento do opérculo (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Nesse sentido, hipotetiza-se que a alta concentração de 2,4-D associada ao estresse inerente ao cultivo *in vitro* alteraram a rota de desenvolvimento das células da região proximal dos embriões zigóticos de gueroba, as desviando da germinação (protusão da raiz) e as direcionando para proliferação celular.

Ainda aos 14 dias em meio de indução, observou-se o surgimento de protuberâncias na região distal entremeadas por tecidos vasculares (Figura 7B, I, J). Essas protuberâncias foram consequentes da intensa divisão de células protodérmicas e, sobretudo, subprotodérmicas, o que ratifica a atividade mitogênica como uma propriedade típica de células embriogênicas (YEUNG, 1995). Ressalta-se que essa região do embrião, também conhecida como região haustorial, é especializada na mobilização e transferência de nutrientes do endosperma para a planta (DEMASON, 1985) e, portanto, é rica em tecidos provasculares e vasculares em diferenciação. Esses tecidos provavelmente contribuíram para a intensa atividade mitótica observada nas células protodérmicas e subprotodérmicas, por se tratarem de uma rota convencional de auxina endógena. Salienta-se que a protoderme também é considerada rota natural de auxina (PETRÁŠEK; FRIML, 2009). Kurczynska *et al.* (2007) consideram que a presença de auxina é um marcador de células consideradas embriogenicamente competentes em embriões zigóticos imaturos de *A. thaliana*.

O padrão de multiplicação celular dessas protuberâncias (divisões celulares da protoderme e subprotoderme), a presença de um certo grau de organização e a incapacidade das suas células de proliferar indeterminadamente sugerem que é improvável que essas formações sejam calos, mas sim o início da formação de embriões somáticos de origem direta e multicelular e que a mudança no padrão de divisões mitóticas pode ser interpretada como a expressão inicial de uma nova sequência de desenvolvimento dessas células consideradas embriogenicamente competentes. Além do mais, as secções histológicas aos 30 e 60 dias evidenciaram protuberâncias isolando-se

completamente do tecido materno mediante fechamento completo da protoderme, o que caracteriza nítidos embriões somáticos em estágio globular (Figura 11B-D). Esse tecido é considerado o primeiro que pode ser indentificado histologicamente no processo de embriogênese (WEST; HARADA, 1993; YEUNG; RAHMAN; THORPE, 1996), bem como um pré-requisito para o desenvolvimento dos estádios embriogênicos posteriores (JONG *et al.*, 1992).

As análises histológicas confirmam as similaridades entre as protuberâncias obtidas a partir de embriões zigóticos de *S. oleracea* com aquelas descritas em *Carya illinoensis* (RODRIGUEZ; WETZSTEIN, 1998), *Quercus suber* (PUIGDERRAJOLS; MIR; MOLINAS, 2001), *Arabidopsis thaliana* (KURCZYNSKA *et al.*, 2007), *Passiflora cincinnata* (ROCHA *et al.*, 2012), *P. edulis* (SILVA *et al.*, 2015) e *Brachypodium distachyon* (OLIVEIRA *et al.*, 2017), porém não há um consenso entre esses autores quanto a classificação dessas estruturas.

Massas de células que não são consideradas calos verdadeiros em função da limitada proliferação e que adquirem protoderme podem ser consideradas, de acordo com Puigderrajols, Mir e Molinas (2001) e Zegzouti, Arnould e Favre (2001), células embriogênicas pré-determinadas que se transformam em embriões somáticos sem redeterminação celular, o que caracteriza a embriogênese somática direta e multicelular. Por outro lado, Rocha *et al.* (2012) baseado em Duhem *et al.* (1989), ressaltam a possibilidade dessas protuberâncias se tratarem de um estágio intermediário entre a embriogênese somática direta e indireta. Já, Oliveira *et al.* (2017) consideram essas formações como calos embriogênicos ou zonas proembriogênicas anexadas ao calo por uma base multicelular.

Apesar das discussões divergentes, aqui é proposto que o comportamento observado em *S. oleracea* está em concordância com o relatado Puigderrajols, Mir e Molinas (2001) e Zegzouti, Arnould e Favre (2001), uma vez que esses autores estão em consonância com o proposto por Maheswaran e Williams (1985) e Williams e Maheswaran (1986) que consideram as células da epiderme de embriões zigóticos células imaturas e pré-embriogenicamente determinadas ou suficientemente próximas desse estado para uma redeterminação mínima e, portanto, passíveis de originar construções multicelulares diretas (embriões somáticos de origem direta e multicelular). Tais células, de acordo com Sharp *et al.* (1980) e Williams e Maheswaran (1986), necessitam apenas de reguladores de crescimento ou de condições que favoreçam a reentrada no ciclo de divisões celulares e subsequente expressão do programa

embriogênico, ou seja, requerem apenas condições “permissivas” para a expressão de um padrão previamente determinado (TISSERAT *et al.*, 1979). Esse comportamento está relacionado, provavelmente, ao fato dessas células apresentarem uma menor distância epigenética do estado embriogênico (MERKLE *et al.*, 1990).

O comportamento multicelular observado aqui é ratificado pela literatura. Conforme Williams e Maheswaran (1986) e Quiroz-Figueroa *et al.* (2006) embriões somáticos de origem multicelular apresentam uma ampla área basal fusionada com o explante materno, como os observados nesse trabalho.

Embora a embriogênese somática direta seja menos frequente em palmeiras, assim como na maioria das famílias de plantas (GAJ, 2004), essa rota embriogênica apresenta as vantagens adicionais de redução do tempo necessário à propagação vegetal (EL BAR; EL DAWAYATI, 2014), bem como decréscimo da ocorrência de variações genéticas (variação somaclonal) (SIVANESAN; LIM; JEONG, 2011; JAYANTHI *et al.*, 2011; IBRAHIM *et al.*, 2013), além de ausência de acúmulo de compostos fenólicos no meio e taxas de contaminação geralmente baixas (MUNISWAMY; SREENATH, 1996; HERRERA *et al.*, 2011).

Em palmeiras, há vários relatos de obtenção de embriões somáticos sem a fase intermediária de calos (GUERRA; HANDRO, 1988, 1991, 1998; LEDO *et al.* 2002; SARASAN; RAMSAY; ROBERTS, 2002; OTHMANI *et al.*, 2009; HEGAZYA; ABOSHAMA, 2010; JAYANTHI *et al.* 2011; SIDKY; ELDAWYATI, 2012; EL BAR; EL DAWAYATI, 2014; ZAYED *et al.* 2016), porém a origem direta de embriões somáticos continua pouco elucidada em termos anatômicos e ultraestruturais em diferentes espécies de palmeiras. Guerra e Handro (1998), que obtiveram com sucesso plantas regeneradas de embriões somáticos de origem direta a partir de embriões zigóticos de *Euterpe edulis*, enfatizam a importância da origem direta quando se objetiva a micropropagação.

Além da reatividade dos tecidos mais externos, atenção também deve ser direcionada para a formação de proembriões (já aos 14 dias) (Figuras 7K e 8F) e de massas meristemáticas (aos 30 dias) (Figura 11G), ambos nas laterais dos cordões procambiais, cuja formação é provavelmente explicada pelo maior fluxo de AIA endógeno nessa região e pela presença de *stem cells* pluripotentes. Multiplicação de células com características embriogênicas nas adjacências dos cordões procambiais também foi relatada por Vasil e Vasil (1982) e Vasil, Lu e Vasil (1985) em gramíneas e de acordo com Vasil e Vasil (1982) está relacionada ao maior aporte de hormônios

nessas áreas. Salienta-se também que as células procambiais (*stem cells* vasculares), que normalmente recrutam a formação dos feixes vasculares (formação dos xilema e floema) dos diferentes órgãos durante o crescimento da planta (FUKUDA, 2004; HE; QU, 2016; CAMPBELL; TURNER, 2017), representam uma via alternativa à formação de calos (LIU *et al.*, 2014; JIANG *et al.*, 2015), órgãos (ROSE *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2014) e embriões somáticos (ROSE, 2016).

Essa possível via de origem de estruturas embriogênicas a partir da divisão de *stem cells* vasculares, ou seja, sem a etapa prévia de desdiferenciação, é fortemente sustentada pela expressão do gene SERK1 (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 1*), considerado marcador da competência embriogênica em diferentes espécies de plantas, cuja expressão ocorre comprovadamente em células procambiais e em tecidos vasculares imaturos (KWAAITAAL; VRIES, 2007). Conforme Kwaaitaal e Vries (2007), após tratamento com auxina exógena, algumas dessas células procambiais tornam-se totipotentes na ausência de sinais "vasculares" normais.

Os proembriões observados já aos 14 dias são considerados por Vries *et al.* (1988) um pré-requisito fundamental à embriogênese somática e são descritos por eles como intermediários estáveis na via morfogênica de transição de células simples em embriões somáticos ou, ainda, como o primeiro estágio distinto e diferenciado da embriogênese somática. A formação de embriões somáticos a partir de proembriões tem sido considerada via típica da origem unicelular de embriões somáticos (HO; VASIL, 1983; MICHAUX-FERRIÈRE; GROUT; CARRON, 1992; ALEMANN; BERTHOULY; MICHAUX-FERRIÈRE, 1996; GOH *et al.*, 2001; VERDEIL *et al.*, 2001; MOURA *et al.*, 2008; SELDIMIROVA; KRUGLOVA, 2013).

Porém, a transição dos proembriões em embriões globulares com protoderme desenvolvida não foi observada nesse trabalho. Alguns deles degeneraram mediante vacuolação celular, comportamento observado aos 90 dias de cultivo (Figura 13F) e também reportado por Canhoto, Mesquita e Cruz (1996). Proembriões de origem unicelular com evolução limitada em sistemas onde a embriogênese ocorre por via multicelular também foram observados em *Elaeis guineensis* (SCHWENDIMAN; PANNETIER; MICHAUX-FERRIÈRE, 1988) e *Theobroma cacao* (ALEMANN; BERTHOULY; MICHAUX-FERRIÈRE, 1996).

Possível início de embriogênese secundária, caracterizada por formações iniciais sobre a protoderme de embriões somáticos globulares primários, foi visualizada aos 60 dias de cultivo (Figura 12), similar ao mencionado por Guerra e Handro (1998) em *E.*

edulis e por Silva *et al.* (2009) em *P. cinnamata* e, de acordo com Yeung (1995), pode ser consequente da incompleta diferenciação da protoderme. De acordo com esses últimos autores, a embriogênese somática secundária prejudicou a germinação dos embriões somáticos primários.

Os 90 e 120 dias em meio com 2,4-D foram marcados pela perda do caráter embriogênico direto e desorganização celular (Figuras 13B e 14B), provavelmente em função do longo tempo de exposição à auxina 2,4-D. Aos 120 dias, regiões protodérmicas apresentavam-se soltas, formando estruturas semelhantes a cordões (Figura 15D-F), similares às aquelas proliferações secundárias mencionadas por Maheswaran e Williams (1985) como *hair-like* durante a embriogênese somática de *Trifolium repens*. Também aos 90 dias de cultivo, foi possível observar embriões somáticos de provável origem unicelular (Figura 13H, I), dada a presença de estruturas semelhantes a suspensor (WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986).

Enfatiza-se que monocotiledôneas, de modo geral, são consideradas mais recalcitrantes ao cultivo *in vitro* que dicotiledôneas (BENSON, 2000). Isso exige maior tempo de exposição a fatores indutores, assim como maior manipulação das condições gerais de cultivo, para que ocorra a transição de células somáticas para embriogênicas e consequente formação de embriões somáticos. Em função dessa ideia clássica, em palmeiras, a formação precoce de embriões somáticos globulares de origem direta e multicelular pode estar sendo negligenciada e, dessa forma, confundida com formações calogênicas iniciais. Essa negligência tem como consequência a longa exposição dos explantes aos tratamentos indutores, principalmente, reguladores de crescimento, que pode ocasionar a desconfiguração daqueles embriões somáticos já formados (perda da característica embriogênica), como observada nesse trabalho, e/ou formação de embriões somáticos anormais. Esses comportamentos certamente estão envolvidos com irregularidades na polaridade mediada por proteínas PIN, o que, segundo Dhonukshe *et al.* (2008), ocorre em função do incremento de auxina endógena ou exógena.

Assim, com base nos resultados obtidos, alerta-se para o tempo de exposição dos explantes de palmeiras durante a embriogênese somática às condições indutoras, como altas concentrações de reguladores de crescimento. Na literatura, há recomendações de redução (BOTTI; VASIL, 1984; GOH *et al.*, 2001; QUIROZ-FIGUEROA *et al.*, 2006; REE; GUERRA, 2015) ou eliminação total do regulador de crescimento do meio de cultivo (VRIES *et al.*, 1988; KAWAHARA; KOMAMINE, 1995; REE; GUERRA, 2015; QUIROZ-FIGUEROA *et al.*, 2006), após a formação de

estruturas com potencial embriogênico. Essa redução ou eliminação inibe a proliferação e promove um gradiente polar de auxina (JIMÉNEZ, 2001, 2005), estimulando a formação de embriões somáticos e o seu desenvolvimento inicial (KAWAHARA; KOMAMINE, 1995; VON ARNOLD *et al.*, 2002; SU *et al.*, 2009). Nesse trabalho, optou-se pela eliminação total, porém, tardia (120 dias), o que certamente comprometeu a qualidade dos embriões somáticos obtidos.

4.2 Caracterização ultraestrutural – células embriogênicas e meristemáticas

A responsividade de células de embriões zigóticos de gueroba à auxina 2,4-D foi constatada pelas análises ultraestruturais (Figuras 4 e 6) que evidenciaram, já aos sete dias de cultivo, a centralização do núcleo e incremento no seu tamanho; desenvolvimento de envelope nuclear mais distinto e com formato irregular; presença predominante de um nucléolo proeminente; incremento da atividade celular demonstrada pela abundância de organelas; fragmentação de vacúolos; espessamento da parede celular; formação de espaços intercelulares e presença de plastídeos com amido na maioria das células. Tais eventos caracterizam a competência embriogênica em células de gueroba e estão em concordância com o conceito de *stem cell* totipotente de Verdeil *et al.* (2007) e assemelham-se, de modo geral, ao descrito por diversos autores em diferentes espécies vegetais (KONAR; THOMAS; STREET, 1972; PROFUMO; GASTALDO; RASCIO, 1987; CANHOTO; MESQUITA; CRUZ, 1996; PUIGDERRAJOLS; MIR; MOLINAS, 2001; VERDEIL *et al.*, 2001; PAN *et al.*, 2011; SELDIMIROVA; KRUGLOVA, 2013; ROCHA *et al.*, 2016; STEINER *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2017; BORJI *et al.*, 2017).

Genes relacionados à movimentação de componentes celulares e subcelulares, como a observada em células de gueroba (exemplo, centralização do núcleo), foram recentemente identificados em calos embriogênicos de *Arabidopsis* e, segundo Magnani *et al.* (2017), evidenciam mudança de fase celular. Apesar do compartilhamento de características durante a aquisição da competência à embriogênese somática entre diferentes sistemas embriogênicos, Rocha *et al.* (2016) salientam que essas características podem variar em função da espécie e condições de cultura.

A abundância de organelas observada nas células embriogênicas (Figuras 4J-P, 6P-R e 8B) e meristemáticas (Figura 8D, E), sobretudo, mitocôndrias, ribossomos e retículos endoplasmáticos, indica intensa síntese de RNA (STEIN *et al.*, 2010) e alta atividade metabólica (PROFUMO; GASTALDO; RASCIO, 1987; STEIN *et al.*, 2010)

e, de acordo com Yeung (1995), esse incremento premitótico na atividade metabólica parece estar associado à formação de células embriogênicas. A distribuição dos retículos endoplasmáticos nas proximidades das membranas plasmáticas também foi mencionada por Konar, Thomas e Street (1972) e Pan *et al.* (2011) em células embriogênicas e a presença de eventuais retículos endoplasmáticos com camadas concêntricas, também observados em outros sistemas embriogênicos (VERDUS *et al.*, 1993; ROCHA *et al.*, 2016), é um indicativo de alta capacidade de síntese de tecidos considerados embriogênicos (VUJICIC; RADOJEVIC; NESKOVIC, 1979).

De modo geral, diferentes autores têm considerado células meristemáticas como sinônimo de células embriogênicas em função do compartilhamento de características, como tamanho reduzido, formato isodiamétrico, alta relação núcleo/citoplasma, vacúolos pequenos (TISSERAT *et al.*, 1979; WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986; FRAGA *et al.*, 2015; CORREDOIRA *et al.*, 2017). Todavia, alguns poucos autores têm feito distinção entre essas duas nomenclaturas, com base em características, como tamanho da célula (BOTTI; VASIL, 1983), diâmetro dos nucléolos (ALEMANNO; BERTHOULY; MICHAUX-FERRIÈRE, 1996), número de nucléolos, formato do núcleo, conteúdo de heterocromatina (VERDEIL *et al.*, 2001; VERDEIL *et al.*, 2007), presença de amido (BOTTI; VASIL, 1983; VERDEIL *et al.*, 2007) e espessamento da parede celular (SANÉ *et al.*, 2006).

Diferentemente de Verdeil *et al.* (2001) que descreveram a transição de células meristemáticas para células embriogênicas, em *gueroba*, dada a origem multicelular, considerou-se o inverso, ou seja, a transição de células embriogênicas para meristemáticas (Figura 8C). Inicialmente células embriogênicas sobretudo subprotodérmicas dividiram-se e deram origem às protuberâncias formadas predominantemente por células meristemáticas, que originaram, posteriormente, embriões somáticos globulares (Figuras 11B, C e 12B, D). As células dessas protuberâncias exibiam muitas mitocôndrias e poucas reservas (Figura 8D, E), indicativos de alta demanda energética necessária às divisões mitóticas.

Verdeil *et al.* (2001) apontaram invaginações nucleares como umas das características exclusivas de células embriogênicas. Células meristemáticas e embriogênicas de *gueroba*, por sua vez, não exibiram distinção com relação ao envelope nuclear, caracterizado em ambas como irregular (Figuras 4K, 6P, R e 7B, D, H) e sem profundas invaginações, como mencionado por Verdeil *et al.* (2001). Em consonância ao relatado por Verdeil *et al.* (2001) e em oposição ao mencionado por Verdeil *et al.*

(2007), algumas células aqui consideradas meristemáticas exibiram quantidade residual de amido (Figura 7H, K), assim como reportado por Rogge-Renner *et al.* (2003) e Woodenberg *et al.* (2013) em células meristemáticas de embriões zigóticos de *Araucaria angustifolia* e *Encephalartos natalensis*, respectivamente.

Por outro lado, em concordância com Verdeil *et al.* (2007), as células meristemáticas de gueroba parecem se distinguirem das embriogênicas em relação ao número de nucléolos, aquelas com um, dois (Figura 8D) ou sem nucléolos definidos e estas com predominantemente um (Figura 8B). Células meristemáticas com um ou dois nucléolos evidentes e embriogênicas com cariomembranas irregulares e apenas um nucléolo proeminente também foram visualizadas por Rogge-Renner *et al.* (2003) em *A. angustifolia* e por Pan *et al.* (2011) em *Musa* spp., respectivamente. A ausência de espaços intercelulares em células consideradas meristemáticas (Figura 8D) corrobora com o salientado por Puigderrajols, Mir e Molinas (2001) e Woodenberg *et al.* (2013).

Segundo análises por MET, as células no interior dos proembriões exibem características que as aproximam mais da classificação como células meristemáticas que embriogênicas, o que corrobora com outros autores (GUZZO *et al.*, 1994; CANHOTO; MESQUITA; CRUZ, 1996; VERDEIL *et al.*, 2001). Dentre essas características, citam-se: ausência de espaços intercelulares (Figura 8G), paredes celulares delgadas e presença de nucléolos proeminentes (um ou dois) ou ausentes (domínios irregulares de heterocromatina) (Figura 8H).

Um fenômeno envolvido na transição embriogênica e objeto de discussão de Williams e Maheswaran (1986) e Yeung (1995) consiste no isolamento celular, evidenciado pelo espessamento da parede celular por meio, por exemplo, da formação de calose (DUBOIS *et al.*, 1990; KURCZYNSKA *et al.*, 2012) e da redução da comunicação simplástica pela ausência de plasmodesmos (VERDEIL *et al.*, 2001). Segundo Verdeil *et al.* (2001), esse isolamento físico pode facilitar a reprogramação das funções genômicas e celulares necessárias à aquisição de totipotência e competência embriogênica. Porém, de acordo com Konar, Thomas e Street (1972), o isolamento necessariamente não é um pré-requisito para a iniciação da embriogênese em células somáticas. Esses últimos autores identificaram proeminente conexão via plasmodesmos em células epidérmicas embriogênicas de *R. sceleratus*.

Em células embriogênicas de gueroba observadas aos sete dias de cultivo, diferentemente do relatado por Verdeil *et al.* (2001), plasmodesmos foram observados (Figura 4Q). A presença de plasmodesmos em células consideradas embriogênicas

também está em concordância com Canhoto, Mesquita e Cruz (1996) em *Feijoa sellowiana*, Pan *et al.* (2011) em *Musa spp.*, Steinmacher *et al.* (2011) em *Bactris gasipaes* e Borji *et al.* (2017) em *Avena sativa*. Por outro lado, nas células externas dos proembriões de gueroaba plasmodesmos não foram verificados, característica comum a essas estruturas (VERDEIL *et al.*, 2001). De acordo com Williams e Maheswaran (1986) se a célula já é pré-determinada para a embriogênese ou se as células vizinhas já são pré-determinadas para a embriogênese naqueles sistemas onde a redeterminação é necessária, o isolamento celular talvez não seja obrigatório.

Segundo Yeung (1995), talvez as mudanças com relação ao número e distribuição dos plasmodesmos ocorridas posteriormente aos eventos iniciais da embriogênese possam ser mais importantes para o desenvolvimento do embrião somático do que aquelas ocorridas inicialmente. Dentro desse contexto, esses autores também levantam o questionamento se de fato é necessário um total isolamento mediante ausência de plasmodesmos ou somente uma alteração na função e/ou distribuição dessas estruturas para que ocorra a iniciação do processo indutivo. Assim, estudos futuros, mais detalhados e focalizados sobre o número, estrutura e funcionamento de plasmodesmos precisam ser realizados durante a embriogênese somática em diferentes espécies, para que esse questionamento seja definitivamente respondido.

Aos sete dias de cultivo, observaram-se também vesículas eletrodensas, partindo da membrana plasmática para apoplasto (Figura 4O), o que coincide com o espessamento das paredes celulares das células embriogênicas. Essas vesículas provavelmente são provenientes de dictiossomas responsáveis pela produção de polissacarídeos de parede (ZHOU; LIU; LI, 2014). Essa relação tráfego de vesículas e reorganização da parede celular de células embriogênicas também foi ressaltada por Verdeil *et al.* (2001) em *Cocos nucifera* e por Seldimirova e Kruglova (2013) em *Triticum aestivum*.

4.3 Caracterização histoquímica - mobilização de reservas

Quanto às reservas, gueroaba acumula predominantemente proteínas e lipídeos (Figura 2), característica comum em outras palmeiras (DEMASON; THOMSON, 1981; DEMASON, 1985; DEMASON, 1988; PANZA; LÁINEZ; MALDONADO, 2004; MOURA; VENTRELLA; MOTOIKE, 2010; RIBEIRO; OLIVEIRA; GARCIA, 2012;

NAZÁRIO *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013; RODRIGUES; MENDONÇA; GENTIL, 2015), com destaque para o endosperma e o cotilédone como as duas regiões responsáveis pelo acúmulo dessas reservas (PANZA; LÁINEZ; MALDONADO, 2004).

Conforme Copeland *et al.* (1999), uma parte significativa do conteúdo proteico de sementes é considerada metabolicamente inativa e subsidia o crescimento do embrião durante o processo germinativo como reserva alimentar, enquanto que a outra parcela, metabolicamente ativa, é formada por enzimas catalisadoras dos processos metabólicos de digestão, translocação e utilização de reservas. Essas proteínas de reserva são acumuladas em vacúolos de armazenamento de proteínas durante a fase de maturação e, nos estágios finais dessa fase, esses vacúolos são convertidos em corpos proteicos delimitados por uma membrana derivada da membrana vacuolar (HARA-NISHIMURA *et al.*, 1987; STRZAŁKA *et al.*, 1995). Já os lipídeos em sementes, também conhecidos como gotas lipídicas, corpos lipídicos ou oleossomos, armazenam triacilgliceróis (TAGs) que estão envolvidos no fornecimento de energia e, possivelmente, na sinalização durante o processo germinativo (LAIBACH *et al.*, 2015).

A distribuição dos corpos lipídicos observada em *gueroba* predominantemente ao redor dos corpos proteicos e/ou de membranas plasmáticas (Figura 3A-E) é um padrão característico de outras palmeiras, como *P. dactylifera* (DEMASON; THOMSON, 1981; DEMASON, 1985; DEMASON, 1988) e de outras espécies pertencentes a diferentes famílias botânicas, como *Olea europaea* (ALCHÉ *et al.*, 2006; ZIENKIEWICZ *et al.*, 2011; ZIENKIEWICZ *et al.*, 2014), *Origanum majorana* (WIŚNIEWSKA *et al.*, 2006) e *Picea abies* (BORNMAN *et al.*, 2003). Uma possível explicação para essa interação corpos proteicos-corpos lipídicos seria o armazenamento de enzimas lipases nas membranas dos corpos proteicos, ou seja, junção enzima-substrato (FERNANDEZ; STAEHELIN, 1987). Zienkiewicz *et al.* (2014) ratificam a hipótese acima e afirmam que os corpos proteicos estão diretamente envolvidos (espacial e funcionalmente) com a mobilização de corpos lipídicos durante o processo germinativo.

Grãos de amido em embriões zigóticos de palmeiras, geralmente, não são comuns, como relatado em *A. aculeata* (MOURA; VENTRELLA; MOTOIKE, 2010; RIBEIRO; OLIVEIRA; GARCIA, 2012), *P. dactylifera* (DEMASON; THOMSON, 1981) e *Washingtonia filifera* (DEMASON, 1988). Em *S. oleracea*, todavia, uma pequena concentração de grãos de amido foi visualizada nas proximidades do eixo embrionário (acima do promeristema radicular), na plúmula (Figura 2F) e na região

haustorial (Figura 2I) dos embriões zigóticos, provavelmente, funcionando como fonte adicional de carbono e energia (SMITH; DENYER, 2003) para o crescimento e desenvolvimento do embrião durante a germinação, similar ao observado em *B. capitata* por Oliveira *et al.* (2013).

As reservas supracitadas são essenciais aos diferentes eventos morfogênicos *in vitro*, com diferentes relatos na literatura sobre a dinâmica da sua mobilização durante o processo de embriogênese somática (BARCIELA; VIEITEZ, 1993; CANHOTO; MESQUITA; CRUZ, 1996; PINTO *et al.*, 2010; ROCHA *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2017). Em gueroba, especificamente a partir do sétimo dia em meio de indução, verificou-se naqueles embriões zigóticos com células reativas o surgimento de grãos de amido em áreas não observadas imediatamente antes da inoculação, como em regiões protodérmicas, e incremento no número de grãos de amido em áreas onde eles já estavam presentes (na região imediatamente acima do promeristema radicular e plúmula) (Figura 5H). As análises com MET revelaram também, aos sete dias, tráfego de vesículas nas laterais dos amiloplastos, o que pode estar relacionado à construção/manutenção das membranas desses plastídeos (LINDQUIST; SOLYMOSI; ARONSSON, 2016). Esse incremento observado em áreas específicas, como plúmula e na região imediatamente acima do promeristema radicular, provavelmente está relacionado com os eventos iniciais da germinação, como mencionado por Oliveira *et al.* (2013) em *B. capitata* e por Silva *et al.* (2014) em *M. flexuosa*. Porém, devido ao alto e contínuo suporte de auxina exógena no meio de indução, a germinação foi bloqueada (ausência de desenvolvimento do eixo embrionário).

Com a evolução do cultivo, mais especificamente dos dias 14 a 30, notou-se surgimento de grãos de amido, sobretudo, em regiões em intensa divisão celular ou nas suas adjacências (Figuras 9C, 10M), como por exemplo, nas proximidades dos cordões procambiais. Como já mencionado, embriões zigóticos de *S. oleracea* não exibem esse composto em quantidades conspícuas como uma fonte principal de reserva, o que indica a ocorrência de síntese *de novo*, similar ao mencionado por Moura *et al.* (2008) em *A. aculeata*, Rocha *et al.* (2012) em *P. cincinnata* e Rocha *et al.* (2016) em *P. edulis*. Ressalta-se também que já a partir do vigésimo primeiro dia de cultivo, notou-se nítido acúmulo de grãos de amido na extremidade proximal da maioria dos embriões zigóticos (Figura 11L), região essa tomada por uma massa calogênica com textura mucilaginosa (aquosa, hidratada). Hipotetiza-se que essa massa calogênica seria uma capa radicular

(coifa) com desenvolvimento bloqueado dada às condições do cultivo *in vitro*, o que justificaria o acúmulo de grãos de amido nessa região (BARLOW, 2003).

Nesse experimento, os grãos de amido têm provido energia para o conjunto de divisões celulares e a sucessiva formação de células embriogênicas e proembriões. O conteúdo de amido diminuiu concomitantemente à diferenciação de áreas embriogênicas, o que realça a ideia de que as reservas polissacarídicas são fundamentais para os processos morfogênicos, assim como previamente salientado por Oliveira *et al.* (2017) em *Brachypodium distachyon*. Eventuais proembriões e embriões somáticos exibiram alguns poucos grãos de amido.

De maneira geral, diversos trabalhos têm associado o acúmulo de grãos de amido nas células adjacentes às células embriogênicas e/ou nas células embriogênicas com a capacidade de formar embriões somáticos (HALPERIN; JENSEN, 1967; LU; VASIL, 1985; PROFUMO; GASTALDO; RASCIO, 1987; PLATA; BALLESTER; VIEITEZ, 1991; BUFFARD-MOREL; VERDEIL; PANNETIER, 1992; BARCIELA; VIEITEZ, 1993; VIEITEZ, 1995; YEUNG, 1995; RODRIGUEZ; WETZSTEIN, 1998; SAMAJ *et al.*, 1999; VERDEIL *et al.*, 2001; MIKULA *et al.*, 2004; SANÉ *et al.*, 2006; MOTOIKE *et al.*, 2007; PAN *et al.*, 2011; STEINMACHER *et al.*, 2011; YUSOFF *et al.*, 2012). Todavia, essa correlação não está totalmente elucidada (MOURA *et al.*, 2008; ROCHA *et al.*, 2012; ROCHA *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2017) e, segundo Schwendiman *et al.* (1988) e Steinmacher *et al.* (2011), não se trata de uma correlação sistemática. Portanto, acúmulo de grãos de amido não pode ser considerado um marcador histoquímico do processo de embriogênese somática (BARCIELA; VIEITEZ, 1993; CANHOTO; MESQUITA; CRUZ, 1996), embora atue nessa via morfogênica fornecendo energia para intensa atividade metabólica e mitótica (CANHOTO; MESQUITA; CRUZ, 1996), ou ainda, exercendo um possível papel regulatório (PUIGDERRAJOLS; MIR; MOLINAS, 2001). Mais atualmente, Navarro *et al.* (2017) apresentaram evidências de que a capacidade embriogênica possa estar relacionada com o potencial de assimilação de carboidratos. Dentro desse contexto, mais estudos são necessários para a completa elucidação do papel do amido na embriogênese somática.

Os grãos de amido observados nos estágios iniciais do processo embriogênico parecem substituir as reservas lipídicas e proteicas em células embriogênicas (Figura 6). A síntese de amido pode estar relacionada à mobilização/uso dos corpos lipídicos, já que incremento no conteúdo de amido foi detectado concomitantemente à redução dos compostos lipídicos já aos sete dias em meio de indução (Figura 6), assim como

relatado por Mansfield e Briarty (1996) durante o processo germinativo de *A. thaliana* e por Rocha *et al.* (2016) durante a embriogênese somática em *P. cincinnata*. A hidrólise dos triglicerídeos (TAGs) que são armazenados em corpos lipídicos gera ácidos graxos livres que são posteriormente oxidados para produzir acetil-CoA. A acetil-CoA é metabolizada via ciclo de glicoxilato, o que resulta na produção de sacarose no citosol (BORNMAN *et al.*, 2003), que pode ser armazenada posteriormente como amido. Salienta-se ainda que além de fonte de energia (SELDIMIROVA; KRUGLOVA, 2013; SELDIMIROVA *et al.*, 2017), os lipídeos estão diretamente envolvidos com a formação de membranas, proporcionando características essenciais para a divisão celular e tráfego de membrana intracelular (VAN MEER; VOELKER; FEIGENSON, 2008), eventos importantes para embriogênese somática.

Profumo, Gastaldo e Rascio (1987) e Pinto *et al.* (2010), por outro lado, salientam a possibilidade da influência da sacarose presente no meio de cultura na produção de amido em sistemas *in vitro*. A sacarose pode ser absorvida via sistema simplástico e, então, consumida e/ou armazenada em vacúolos ou convertida em amido (ILIE-GRUBOR; ATTREE; FOWKE, 1998).

Quanto às reservas proteicas, a partir dos 14 dias em meio de indução observou-se um declínio no seu conteúdo (Figura 9D) que era inicialmente alto nos explantes imediatamente antes da inoculação (Figuras 2 e 3) e em algumas células embriogênicas observadas aos sete dias de cultivo, localizadas, principalmente, na região proximal dos embriões zigóticos (Figura 5K-M). Esse composto de reserva praticamente se esgota aos 30 dias de cultivo (Figura 11N), limitando-se a resquícios dentro de largos vacúolos, o que confirma sua degradação como fonte de energia para a formação dos embriões somáticos, sobretudo, daqueles embriões somáticos localizados mais próximos da região proximal (região mediana), local de maior concentração de proteínas nos estágios iniciais do cultivo. Inclusive, os embriões somáticos localizados preferencialmente mais próximos da região proximal (região mediana) foram os primeiros a apresentarem total independência do tecido materno, com protoderme totalmente fechada (Figura 11B, C).

O declínio das reservas proteicas observado nesse trabalho, assemelha-se ao relatado em outros sistemas embriogênicos (BARCIELA; VIEITEZ, 1993; ROCHA *et al.*, 2012; ROCHA *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2015) e coincide com o padrão de consumo proteico verificado durante o processo de germinação de diferentes espécies vegetais (ZIENKIEWICZ *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Durante a germinação, o material armazenado dentro dos corpos proteicos é degradado por autólise, o que resulta em pequenos vacúolos que posteriormente se fundem e geram um vacúolo central (PERNOLLET, 1978). Rocha *et al.* (2012) sugerem que a degradação de corpos proteicos durante o processo de embriogênese somática em *P. cincinnata* está relacionada à ação de endo e exopeptidases. Segundo Müntz *et al.* (2001), proteínas e proteases são transportadas para o mesmo vacúolo de armazenamento de proteína, porém as proteases permanecem inativas em função da presença de fatores de inibição durante o desenvolvimento da semente. Posteriormente, essas proteases são ativadas, levando à degradação das proteínas dentro dos vacúolos.

De modo geral, não foram observados compostos de reservas nos embriões somáticos obtidos, exceto pela presença de alguns grãos de amido em uma das extremidades de embriões somáticos observados aos 60 dias (Figuras 12G, 13B, C), similar ao relatado por Berthouly e Michaux-Ferriere (1996) em *Coffea canephora*. A ausência de reservas em quantidades conspícuas nos embriões somáticos globulares está em concordância com Brisibe *et al.* (1993), o que seria, conforme esses autores, uma consequência do intenso metabolismo precedente à maturação dos embriões somáticos. Salienta-se, nesse contexto, que as análises por MET de embriões somáticos observados aos 60 dias evidenciaram intensa atividade metabólica (abundância de diferentes organelas) (Figura 13C-F), o que corrobora com Brisibe *et al.* (1993). Segundo Müntz (1987), a síntese e acúmulo de reservas como proteínas em tecidos de embriões zigóticos ocorre somente após as divisões mitóticas cessarem.

4.4 Barreira fenólica, calose e pectina

A partir de 14 dias de cultivo, uma barreira fenólica conspícua foi observada entre células embriogênicas/proembriões e células não embriogênicas nas seções anatômicas de regiões dos explantes em contato direto com o meio de cultivo ou mais próximas do meio de cultivo (Figuras 9G-I, 10H-K, 11H-J e 12D-F). Essa barreira foi identificada por meio dos corantes Azul de Toluidina, Dicromato de Potássio e Azul de Anilina, que exibiram coloração esverdeada (Figuras 9G, 10 H, I, 11H e 12D), amarronzada (Figuras 9H, 10J, 11I e 12E) e azul e amarelo brilhante (Figuras 9I, 10K, 11J e 12F), respectivamente. Concomitantemente à formação da barreira fenólica observou-se também, mediante uso do corante Azul de Anilina sob excitação com luz ultravioleta, a presença de calose nas paredes celulares de algumas dessas células

embriogências e/ou proembriões localizadas nas proximidades das barreiras (Figuras 11J e 12F).

Apesar dos vários relatos dos efeitos negativos ao cultivo *in vitro* dos produtos da oxidação de compostos fenólicos (BHAT; CHANDEL, 1991; NAZ; ALI; IQBAL, 2008; AHMAD *et al.*, 2013), a sua presença em sistemas embriogênicos é recorrente na literatura (ALEMANNO; BERTHOULY; MICHAUX-FERRIÈRE, 1996; CANHOTO; CRUZ, 1996; CANHOTO; MESQUITA; CRUZ, 1996; CVIKROVÁ *et al.*, 1998; CANHOTO; LOPES; CRUZ, 1999; REIS; BATISTA; CANHOTO, 2008; ZAYED; ELBAR, 2015; ZAYED *et al.*, 2016; CORREDOIRA *et al.*, 2017; GRANJA *et al.*, 2018), com indícios de efeitos positivos nessa via morfogênica. Todavia, pouca atenção tem sido direcionada para a elucidação desses efeitos, não sendo claro de que modo os compostos fenólicos favorecem/promovem a embriogênese somática (REIS; BATISTA; CANHOTO, 2008).

Cangahuala-Inocente *et al.* (2004), por exemplo, mencionaram isolamento do embrião somático do tecido materno via compostos fenólicos, todavia, os autores não explicaram o possível papel desses compostos. Dunstan, Short e Thomas (1978) relataram uma zona formada por células senescentes produtoras de um pigmento, semelhante ao visualizado nos cortes anatômicos desse trabalho, e que naquela ocasião, provavelmente, se tratava de compostos fenólicos. Em palmeiras, especificamente em *E. edulis*, Steinmacher *et al.* (2011) também observaram acumulação de compostos fenólicos em setores dos calos onde embriões somáticos se desenvolveram. Esses últimos autores correlacionaram, com base em outros relatos, a acumulação desses compostos fenólicos ao um possível isolamento simplástico.

Essa correlação embriogênese somática e compostos fenólicos talvez possa ser melhor elucidada com base em modificações epigenéticas. Causevic *et al.* (2005) encontraram uma relação negativa entre compostos fenólicos derivados da parede celular e o grau de metilação de DNA. Resultados semelhantes foram relatados por Nic-Can *et al.* (2015) em *Coffea* spp. Esses últimos autores verificaram que o decréscimo do grau de metilação de DNA, em função da presença de compostos fenólicos, pode prejudicar o processo de embriogênese somática. Com base nesses achados, De-la-Peña *et al.* (2015) afirmam que a instabilidade dos níveis de metilação de DNA, em função da acumulação de compostos fenólicos, poderia ser uma das principais causas de alterações no metabolismo celular necessárias ao desenvolvimento de estruturas embriogênicas a partir de células somáticas.

De modo geral, acredita-se que a hipometilação está associada a tecidos embriogênicos, ou seja, que calos embriogênicos exibem menor grau de metilação de DNA do que aqueles não embriogênicos, sendo considerada por De-la-Peña *et al.* (2015), um pré-requisito para o sucesso da indução da embriogênese somática. Nesse contexto, a barreira fenólica observada entre células embriogênicas e as células não responsivas do embrião zigótico pode estar, mediante hipometilação, favorecendo a proliferação de mais células embriogênicas, o que exige investigação futura para afirmação definitiva.

Além da possível relação dos compostos fenólicos e eventos epigenéticos durante a formação de células embriogênicas em gueroba, duas outras possíveis hipóteses não podem ser descartadas. A primeira seria que os compostos fenólicos estariam exercendo uma função protetiva contra às condições estressantes *in vitro* (por exemplo, à alta concentração de 2,4-D), em concordância com Alemanno *et al.* (2003) e com base em Dixon e Paiva (1995). Salienta-se que esses compostos foram visíveis, sobretudo, em células mais próximas do meio de cultura suplementado com alta dose de 2,4-D, onde o aporte de auxina exógena é significativamente maior do que naquelas regiões mais distantes, o que sustenta fortemente essa hipótese.

Já a segunda hipótese estaria relacionada à participação dos compostos fenólicos com a metabolização de auxina. Conforme Almeida *et al.* (2012), os compostos fenólicos podem potencializar o efeito da auxina adicionada ao meio de indução, uma vez que alguns desses compostos podem estar envolvidos com a regulação de AIA livre (VOLPERT *et al.*, 1995; SCHNABLOVÁ *et al.*, 2006). De acordo com Ndoumou *et al.* (1997), compostos fenólicos podem se portar como um ótimo substrato para enzimas oxidativas como AIA-oxidase e conseqüentemente, podem favorecer a disponibilização de auxina livre. Mais recentemente, Zhou *et al.* (2016) sugeriram que compostos polifenólicos, como os flavonoides, podem exercer papel antioxidante (controlando os níveis de espécies reativas de oxigênio) e modular o transporte de auxina. Outra explicação seria a possível participação dos compostos fenólicos como mensageiros secundários envolvidos na sinalização da percepção da auxina indutora 2,4-D.

Concomitantemente à formação de uma barreira rica em compostos fenólicos, observou-se, a partir dos 30 dias de cultivo, deposição de calose em algumas células embriogênicas e proembriões (Figuras 11J e 12F), o que é, segundo Dubois *et al.* (1990) e Pedroso e Pais (1992), um marcador das primeiras modificações metabólicas que conduzem à embriogênese somática. Conforme Vries e Weijers (2017), um dos fatores

envolvidos na reprogramação celular consiste na interação com células vizinhas (interações estimulatórias e inibitórias), mediadas por moléculas de sinalização. A deposição de calose (β , 1,3 - glucanos) e consequente espessamento da parede celular está diretamente relacionada com a interrupção dessa comunicação intercelular (fechamento de plasmodesmos – via simplástica), o que pode estimular a reprogramação de células embriogenicamente competentes e induzir o desenvolvimento do embrião somático (MOON *et al.*, 2015) de origem unicelular (YOU; YI; CHOI, 2006). De acordo com Dubois *et al.* (1990), a calose nem sempre é homogênea e se torna mais fraca na medida que o embrião vai se desenvolvendo.

Esse evento comum a outros sistemas embriogênicos (VERDEIL *et al.*, 2001; YOU; YI; CHOI, 2006; TESTILLANO; RISUEÑO, 2009; TAO *et al.*, 2012; MAZRI *et al.*, 2013; POPIELARSKA-KONIECZNA *et al.*, 2015), de acordo com Williams e Maheswaran (1986), previne a interferência de células adjacentes que estão em processo de degeneração ou determinadas a seguirem outras vias. Ressalta-se que a calose é naturalmente uma resposta fisiológica comum a diferentes fatores estressores (ZAVALIEV *et al.*, 2011), o que suporta a hipótese que a embriogênese somática seja uma resposta de adaptação do genoma vegetal ao estresse típico do cultivo *in vitro* (DUDITS *et al.*, 1995; KARAMI; SAID, 2010; JIN *et al.*, 2014; NOWAK; GAJ, 2016).

Além da presença de compostos fenólicos e de calose, identificou-se pectina entre algumas células embriogênicas e proembriões por meio do corante Vermelho de Rutênio (Figura 9F). A presença de compostos polissacarídicos entre células embriogênicas, conforme Goh *et al.* (2001), é consequente de modificações da lamela média e parede primária celular e é um indicativo de qualidade celular para o desenvolvimento subsequente. De acordo com Popielarska-Konieczna *et al.* (2015), pectinas, em sistemas morfogênicos, funcionam como reservatório de água e de molécula envolvidas na sinalização.

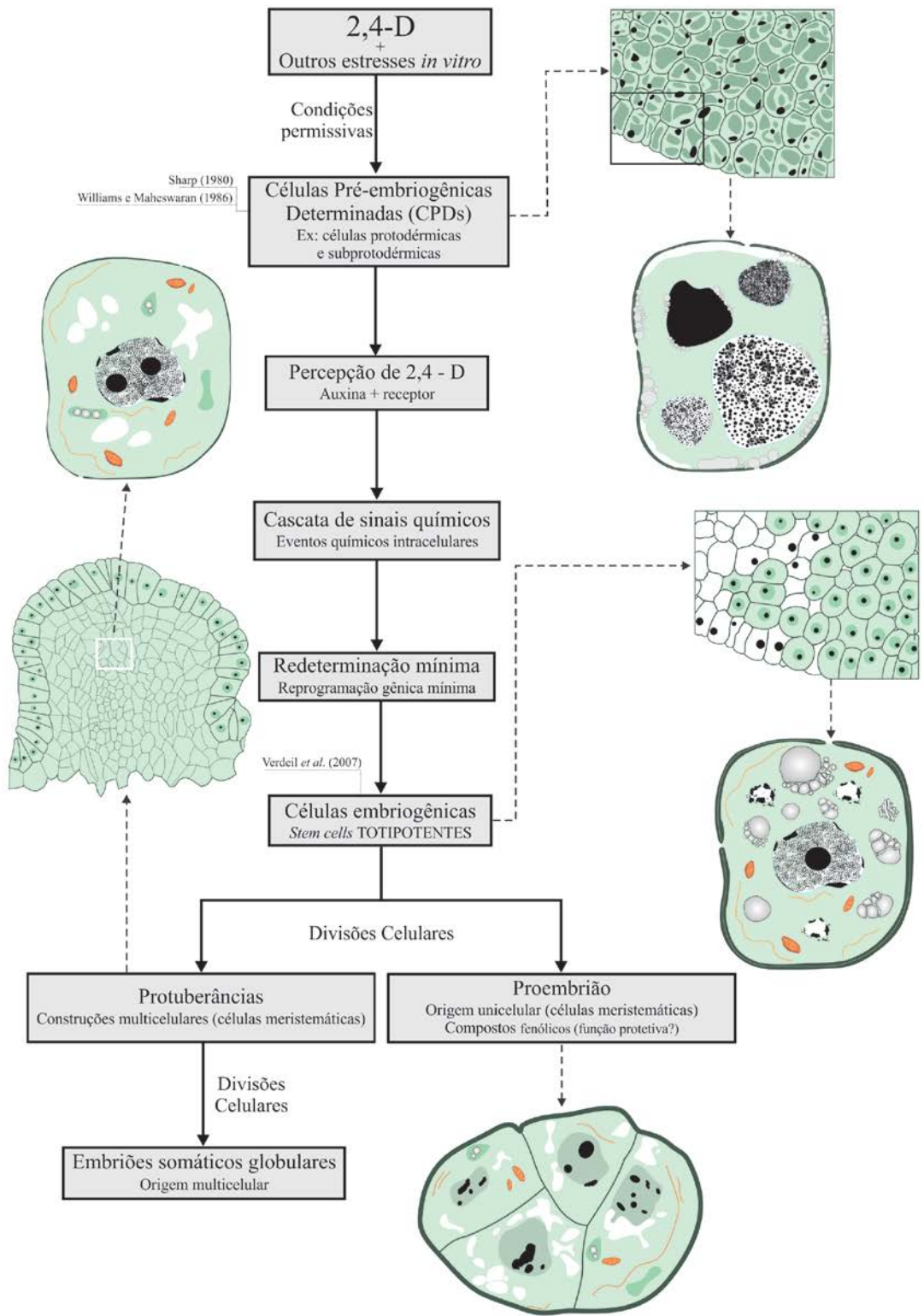


Figura 11. Embriogênese somática direta a partir de embriões zigóticos de *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc. (gueroba). A via embriogênica é iniciada a partir da exposição de células de embriões zigóticos maduros à alta concentração da auxina 2,4-D e a outros estresses inerentes ao cultivo *in vitro*, que caracterizam as condições permissivas para que a embriogênese ocorra. Células pré-embriogenicamente determinadas (terminologia de Sharp *et al.*, 1980/ Williams e Maheswaran, 1985) localizadas, sobretudo, na protoderme e subprotoderme dos embriões zigóticos, sob a influência dessas condições permissivas, principalmente, do 2,4-D, sofrem uma redeterminação mínima (reprogramação gênica mínima) e tornam-se embriogênicas ou *stem cells* totipotentes (modificações ultraestruturais coincidentes com o relatado por Verdeil *et al.* 2007). Uma vez totipotentes, essas células sofrem divisões celulares que dão origem às protuberâncias, as quais, posteriormente, evoluem para embriões somáticos globulares de origem direta e multicelular, e a proembriões (construções de origem unicelular). Protuberâncias e proembriões exibem células meristemáticas (paredes celulares delgadas, presença predominante de dois nucléolos ou ausência de nucléolo definido – heterocromatina irregular, amiloplastos com poucos grãos de amido ou desprovidos de grãos de amido). Proembriões formados a partir da divisão de células localizadas mais próximas do meio de cultivo são envoltos por compostos fenólicos (barreira fenólica visualizada entre células embriogênicas e/ou proembriões e células não embriogênicas). Dentre outras hipóteses, acredita-se que essa barreira fenólica, provavelmente, possui função protetiva contra as altas concentrações de 2,4-D inerentes à proximidade com meio de cultivo.

5. CONCLUSÕES

- Embriões zigóticos maduros de *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc. (gueroba) exibem células pré-embriogenicamente determinadas ou suficientemente próximas desse estado para uma redeterminação mínima e, portanto, passíveis de originar construções multicelulares diretas (embriões somáticos de origem direta e multicelular). Essas células estão localizadas, sobretudo, na protoderme e subprotoderme dos embriões zigóticos.
- Células embriogênicas, via de regra, exibem características meristemáticas, porém, células meristemáticas se distinguem das embriogênicas em termos ultraestruturais.
- A eliminação total, porém, tardia (120 dias) da auxina indutora (2,4-D) da embriogênese somática em embriões zigóticos de *S. oleracea* compromete a qualidade dos embriões somáticos obtidos diretamente.
- Amido e proteína se destacam como fontes de energia para a formação de áreas embriogênicas, a partir de células de embriões zigóticos de *S. oleracea*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, I.; HUSSAIN, T.; ASHRAF, I; NAFEES, M.; MARYAM; RAFAY, M.; IQBAL, M. Lethal effects of secondary metabolites on plant tissue culture. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v. 13, n. 4, p. 539-547, 2013.

ALCHÉ, J. D.; JIMÉNEZ-LÓPEZ, J. C.; WANG, W.; CASTRO-LÓPEZ, A. J.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I. Biochemical characterization and cellular localization of 11S type storage proteins in Olive (*Olea europaea* L.) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 5562-5570, 2006.

ALEMANN, L.; BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIÈRE, N. Histology of somatic embryogenesis from floral tissues cocoa. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 46, p. 187-194, 1996.

ALEMANN, L.; RAMOS, T.; GARGADENEC, A.; ANDARY, C.; FERRIERE, N. Localization and identification of phenolic compounds in *Theobroma cacao* L. somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, v. 92, n. 4, p. 613-623, 2003.

ALMEIDA, M.; ALMEIDA, C. V.; GRANER, E. M.; BRONDANI, G. E.; ABREU-TARAZI, M. F. Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study. **Plant Cell Reports**, v. 31, p. 1495-1515, 2012.

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.

BARCIELA, J.; VIEITEZ, A. M. Anatomical sequence and morphometric analysis during somatic embryogenesis on cultured cotyledon explants of *Camellia japonica* L. **Annals of Botany**, v. 71, n. 5, p. 395-404, 1993.

BARLOW, P. W. The root cap: cell dynamics, cell differentiation and cap function. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 21, p. 261-286, 2003.

BENSON, E. E. Special symposium: *in vitro* plant recalcitrance - *In vitro* plant recalcitrance: an introduction. **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 36, p. 141-148, 2000.

BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIERE, N. M. High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 44, p. 169-176, 1996.

BHAT, S. R.; CHANDEL, K. P. S. A novel technique to overcome browning in tissue culture. **Plant Cell Reports**, v. 10, 358-361, 1991.

BHAT, S. V.; BOOTH, S. C.; MCGRATH, S. G. K.; DAHMS, T. E. S. *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae 3841 Adapts to 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid with “Auxin-Like” Morphological Changes, Cell Envelope Remodeling and Upregulation of Central Metabolic Pathways. **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1-21, 2015.

BORJI, M.; BOUAMAMA-GZARA, B.; CHIBANI, F.; TEYSSIER, C.; AMMAR, A. B.; MLIKI, A.; ZEKRI, S.; GHORBEL, A. Micromorphology, structural and ultrastructural changes during somatic embryogenesis of a Tunisian oat variety (*Avena sativa* L. var ‘Meliane’). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, p. 1-14, 2017.

BORNMAN, C. H.; DICKENS, O. S. P.; MERWE, C. F. VAN DER; COETZEE, J.; BOTHA, A. M. Somatic embryos of *Picea abies* behave like isolated zygotic embryos *in vitro* but with greatly reduced physiological vigour. **South African Journal of Botany**, v. 69, n. 2, p. 176-185, 2003.

BOTTI, C.; VASIL, I. K. Ontogeny of somatic embryos of *Pennisetum americanum*. II. In cultured immature inflorescences. **Canadian Journal of Botany**, v. 62, p. 1629-1635, 1984.

BRISIBE, E. A.; NISHIOKA, D.; MIYAKE, H.; TANIGUCHI, T.; MAEDA, E. Developmental electron microscopy and histochemistry of somatic embryo differentiation in sugarcane. **Plant Science**, v. 89, p. 85-92, 1993.

BUFFARD-MOREL, J.; VERDEIL, J.-L.; PANNETIER, C. Embryogenèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) à partir d'explants foliaires: étude histologique. **Canadian Journal of Botany**, v. 70, p. 735-741, 1992.

CAMPBELL, L.; TURNER, S. Regulation of vascular cell division. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 1, p. 27-43, 2017.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; STEINER, N.; SANTOS, M.; GUERRA, M. P. Morphohistological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. **Protoplasma**, v. 224, p. 33-40, 2004.

CANHOTO, J. M.; CRUZ, G. S. Histodifferentiation of somatic embryos in cotyledons of pineapple guava (*Feijoa sellowiana* Berg). **Protoplasma**, v. 191, p. 34-45, 1996.

CANHOTO, J. M.; LOPES, M. L.; CRUZ, G. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle (Myrtaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 57, p. 13-21, 1999.

CANHOTO, J. M.; MESQUITA, J. F.; CRUZ, G. S. Ultrastructural changes in cotyledons of pineapple guava (Myrtaceae) during somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, v. 78, p. 513-521, 1996.

CAUSEVIC, A.; DELAUNAY, A.; OUNNAR, S.; RIGHEZZA, M.; DELMOTTE, F.; BRIGNOLAS, F.; HAGÈGE, D.; MAURY, S. DNA methylating and demethylating treatments modify phenotype and cell wall differentiation state in sugarbeet cell lines. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 681-691, 2005.

COPELAND, L. O.; MCDONALD, M. B. The Chemistry of Seeds. In: COPELAND, L. O.; MCDONALD, M. B. **Principles of Seed Science and Technology**. Boston: Springer, 1999. p. 40-58.

CORREDOIRA, E.; CANO, V.; BÁRÁNY, I.; SOLÍS, M.-T.; RODRÍGUEZ, H.; VIEITEZ, A.-M.; RISUEÑO, M. C.; TESTILLANO, P. S. Initiation of leaf somatic embryogenesis involves high pectin esterification, auxin accumulation and DNA demethylation in *Quercus alba*. **Journal of Plant Physiology**, v. 213, p. 42-54, 2017.

CURRIER, H. B. Callose substances in plant cells. **American Journal of Botany**, v. 44, n. 6, pp. 478-488, 1957.

CVIKROVÁ, M.; MALÁ, J.; JOSEF, E.; HRUBCOVZÁ, M.; VÁGNER, M. Abscisic acid, polyamines and phenolic acids in sessile oak somatic embryos in relation to their conversion potential. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 36, n. 3, p. 247-255, 1998.

DE-LA-PEÑA, C.; NIC-CAN, G. I.; GALAZ-ÁVALOS, R. M.; AVILEZ-MONTALVO, R.; LOYOLA-VARGAS, V. M. The role of chromatin modifications in somatic embryogenesis in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 635, 2015.

DEMASON, D. A. Embryo structure and storage reserve histochemistry in the palm *Washingtonia filifera*. **American Journal of Botany**, v. 75, n. 3, p. 330-337, 1988.

DEMASON, D. A. Histochemical and ultrastructural changes in the haustorium of date (*Phoenix dactylifera* L.). **Protoplasma**, v. 126, p. 168-177, 1985.

DEMASON, D. A.; THOMSON, W. W. Structure and ultrastructure of the cotyledon of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **Botanical Gazette**, v. 142, n. 3, p. 320-328, 1981.

DHONUKSHE, P.; TANAKA, H.; GOH, T.; EBINE, K.; MÄHÖNEN, A. P.; PRASAD, K.; BLILOU, I.; GELDNER, N.; XU, J.; UEMURA, T.; CHORY, J.; UEDA, T.; NAKANO, A.; SCHERES, B.; FRIML, J. Generation of cell polarity in plants links endocytosis, auxin distribution and cell fate decisions. **Nature**, v. 456, p. 962-966, 2008.

DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-Induced phenylpropanoid metabolism. **The Plant Cell**, v. 7, p. 1085-1097, 1995.

DUBOIS, T. M.; GUEDIRA, J.; DUBOIS, J.; VASSEUR, J. Direct somatic embryogenesis in roots of *Cichorium*: as callose an early marker? **Annals of Botany**, v. 65, p. 539-545, 1990.

DUDITS, D.; GYÖRGYÉY, J.; BÖGRE, L.; BAKO, L. **Molecular biology of somatic embryogenesis**. In: THORPE, T. A. (Ed.). *In vitro* Embryogenesis in Plants. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 267-308.

DUHEM, K.; LE MERCIER, N.; BOXUS, P. Données nouvelles sur l'induction et le développement d'embryons somatiques chez *Theobroma cacao* L. **Café Cacao Thé**, v. 33, p. 9-14, 1989.

DUNSTAN, D. I.; SHORT, K. C.; THOMAS, E. The anatomy of secondary morphogenesis in cultured scutellum tissues of *Sorghum bicolor*. **Protoplasma**, v. 97, p. 251-260, 1978.

EEUWENS, C. J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants Excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v. 36, p. 23-28, 1976.

EL BAR, O. H. A.; EL DAWAYATI, M. M. Histological changes on regeneration *in vitro* culture of date palm (*Phoenix dactylifera*) leaf explants. **Australian Journal of Crop Science**, v. 8, n. 6, p. 848-855, 2014.

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

EMONS, A. M. C. Somatic embryogenesis: cell biological aspects. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 43, n. 1, p.1-14, 1994.

ESCHRICH, W.; CURRIER, H. B. Identification of callose by its diachrome andndfluorochrome reactions. **Stain Technology**, v. 39, p. 303-307, 1964.

FEHÉR, A. Somatic embryogenesis – stress-induced remodeling of plant cell fate. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1849, n. 4, p. 385-402, 2015.

FEHÉR, A. Why somatic plant cells start to form embryos? In: MUJIB, S.; SAMAJ, J. (Eds.). **Somatic embryogenesis**. Heidelberg: Plant Cell Monographs, Springer, 2006. p. 85-101.

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

FERNANDEZ, D. E.; STAEHELIN, L. A. Does gibberellic acid induce the transfer of lipase from protein bodies to lipid bodies in barley aleurone cells. **Plant Physiology**, v. 85, p. 487-496, 1987.

FRAGA, H. P. F.; VIEIRA, L. N.; PUTTKAMMER, C. C.; OLIVEIRA, E. M.; GUERRA, M. P. Time-lapse cell tracking reveals morphohistological features in somatic embryogenesis of *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Kuntze. **Trees**, v. 29, n. 5, p. 1613-1623, 2015.

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.

FUKUDA, H. Signals that control plant vascular cell differentiation. **Nature Reviews, Molecular Cell Biology**, v. 5, 379-391, 2004.

- GABE, M. **Techniques histologiques**. Paris: Masson et Cie, 1968. 1113 p.
- GAJ, M. D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation**, v. 43, p. 27-47, 2004.
- GENOVESE-MARCOMINI, P. R.; MENDONÇA, M. S.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. Embryonic development of *Syagrus inajai* (Spruce) Becc. (Arecaceae, Arecoideae), an Amazonian. **Australian Journal of Botany**, v. 61, p. 611-621, 2013.
- GOH, D. K. S.; BON, 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, p. 375-381, 2001.
- GRANJA, M. M. C.; MOTOIKE, S. Y.; ANDRADE, A. P. S.; CORREA, T.R., PICOLI, E. A. T.; KUKI, K. N. Explant origin and culture media factors drive the somatic embryogenesis response in *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart., an emerging oil crop in the tropics. **Industrial Crops & Products**, v. 117, p. 1-12, 2018.
- GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae): control and structural features. **Journal of Plant Research**, v. 111, p. 65-71, 1998.
- GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo cultures of *Euterpe edulis* Mart. (palmae). **Plant Cell Reports**, v. 7, p. 550-552, 1988.
- GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis in tissue cultures of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). In: AHUJA, M. R. (Ed.). **Woody Plant Biotechnology**. New York: Plenum Press, 1991. p. 189-196.
- GUZZO, F.; BALDAN, B.; MARIANI, P.; LO SCHIAVO, F.; TERZI, M. Studies on the origin of totipotent cells in explants of *Daucus carota* L. **Journal of Experimental Botany**, v. 45, n. 279, p. 1427-1432, 1994.
- HACCIUS, B.; PHILIP, V. J. Embryo development in *Cocos nucifera* L.: a critical contribution to a general understanding of palm embryogenesis. **Plant Systematics and Evolution**, v. 132, p. 91-106, 1979.
- HALPERIN, W.; JENSEN, W. A. Ultrastructural changes during growth and embryogenesis in carrot cell cultures. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 18, p. 428-443, 1967.
- HARA-NISHIMURA I, HAYASHI M, NISHIMURA M, AKAZAWA T. Biogenesis of protein bodies by budding from vacuoles in developing pumpkin cotyledons. **Protoplasma**, v. 136, p. 49-55, 1987.
- HE, X-Q.; QU, L.-J. Cellular and molecular features of the procambium and cambium in plant vascular tissue development. In: ROSE, R. J. (Ed.). **Molecular cell biology of**

the growth and differentiation of plant cells. Boca Raton: CRC Press, 2016. p. 236 - 256.

HEGAZY, A. E.; ABOSHAMA, H. M. An efficient novel pathway discovered in date palm micropropagation. **Acta Horticulturae**, v. 882, p. 167-176, 2010.

HERRERA, J. C.; CORTINA, H. A.; ANTHONY, F.; PRAKASH, N. S.; LASHERMES, P.; GAITÁN, A. L.; CRISTANCHO, M. A.; ACUÑA, R.; LIMA, D. R. Coffee (*Coffea* spp.). In: SINGH, R. J. (Ed.). **Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement Series – Medicinal Plants.** Boca Raton: CRC Press. 2011. p. 589-640.

HO, W.-J.; VASIL, I. K. Somatic Embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) I. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. **Protoplasma**, v. 118, p. 69-180, 1983.

HORSTMAN, A.; BEMER, M.; BOUTILIER, K. A transcriptional view on somatic embryogenesis. **Wiley Regeneration**, v. 4, n. 4, p. 201-216, 2017.

HUGHES, J.; MCCULLY, M. E. The use of an optical brightener in the study of plant structure. **Stain Technology**, v. 50, p. 319-329, 1975.

IBRAHIM, M. S. D.; HARTATI, R. S.; RUBIYO; PURWITO, A.; SUDARSONO. Direct and indirect somatic embryogenesis on Arabica Coffee (*Coffea arabica*). **Indonesian Journal of Agricultural Science**, v. 14, n. 2, p. 79-86, 2013.

ILIÉ-GRUBOR, K.; ATTREE, S. M.; FOWKE, L.C. Induction of of microspore-derived embryos of *Brassica napus* L. with polyethylene glycole (PEG) as osmoticum in a low sucrose medium. **Plant Cell Reports**, v. 17, n. 1, p. 329-333.

INGENSIEP, H.-W. The morphogenetic response of intact pea seedlings with respect to translocation and metabolism of root-applied auxin. **Z. Pflanzensphysiol.**, v. 105, n. 149-164, 1982.

ISAH, T. Induction of somatic embryogenesis in woody plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 118, p. 1-22, 2016.

JAYANTHI, M.; MOHAN, N. M.; MANDAL, P. K. Direct somatic embryogenesis and plantlet regeneration in oil palm. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 20, p. 249-251, 2011.

JIANG, F.; FENG, Z.; LIU, H.; ZHU, J. Involvement of plant stem cells or stem cell-like cells in dedifferentiation. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 1028, p. 1-6, 2015.

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

JIMÉNEZ, V. M. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 2, p. 196-223, 2001.

JIN, F. Y.; HU, L. S.; YUAN, D. J.; XU, J.; GAO, W. H.; HE, L. R.; YANG, X. Y.; ZHANG, X. L. Comparative transcriptome analysis between somatic embryos (SEs) and zygotic embryos in cotton: evidence for stress response functions in SE development. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, p. 161-173, 2014.

JOHANSEN, D. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill, 523 p. 1940.

JONES, T. J.; ROST, T. L. The developmental anatomy and ultrastructure of somatic embryos from rice (*Oryza sativa* L.) scutellum epithelial cells. **Botanical Gazette**, v. 150, n. 1, p. 41-49, 1989.

JONG, A. J.; CORDEWENER, J.; SCHIAVO, F.; TERZI, M.; VANDEKERCKHOVE, J.; KAMMEN, A. V.; VRIES, S. C. A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. **The Plant Cell**, v. 4, p. 425-433, 1992.

KARAMI, O.; SAID, A. The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. **Molecular Biology Reports**, v. 37, p. 2493-2507, 2010.

KARNOVSKY, M. J. A. formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137-138, 1965.

KAWAHARA, R.; KOMAMINE, A. Molecular basis of somatic embryogenesis. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry: Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed**. Berlin: Springer – Verlag, 1995. p. 30-40.

KIKUCHI, A.; SANUKI, N.; HIGASHI, K.; KOSHIBA, T.; KAMADA, H. Abscisic acid and stress treatment are essential for the acquisition of embryogenic competence by carrot somatic cells. **Planta**, v. 223, p. 637-645, 2006.

KONAR, R. N.; THOMAS, E.; STREET, H. E. Origin and structure of embryoids arising from epidermal cells of the stem of *Ranunculus sceleratus* L. **Journal of Cell Science**, p. 77-93, 1972.

KURCZYNSKA, E. U.; GAJ, M. D.; UJCZAK, A.; MAZUR, E. Histological analysis of direct somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Planta**, v. 226, p. 619-628, 2007.

KURCZYNSKA, E. U.; POTOCKA, I.; DOBROWOLSKA, I.; KULINSKA-LUKASZEK, K.; SALA, K.; WROBEL, J. Cellular markers for somatic embryogenesis. In: SATO, K. I. (Ed.). **Embryogenesis**. InTech, 2012, p. 307-332.

KWAAITAAL, M. A. C. J.; VRIES, S. C. The SERK1 gene expressed in procambium and immature vascular cells. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 11, p. 2887-2896, 2007.

LAIBACH, N.; POST, J.; TWYMAN, R. M.; GRONOVER, S. C.; PRÜFER, D. The characteristics and potential applications of structural lipiddroplet proteins in plants. **Journal of Biotechnology**, v. 201, p. 15-27, 2015.

LEDO, A. S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K.; de 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, p. 601-603, 2002.

LELJAK-LEVANIĆ, D.; MIHALJEVIC, S.; BAUER, N. Somatic and zygotic embryos share common developmental features at the onset of plant embryogenesis. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, n. 127, p. 1-14, 2015.

LINDQUIST, E.; SOLYMOSI, K.; ARONSSON, H. Vesicles are persistent features of different plastids. **Traffic**, v. 17, n. 10, p. 1125-38, 2016.

LIU, J.; SHENG, L.; XU, Y.; LI, J.; YANG, Z.; HUANG, H.; XU, L. 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**, v. 26, n. 3, p. 1081-1093, 2014.

LU, C. Y.; VASIL, I. K. Histology of somatic embryogenesis in *Panicum maximum* (Guinea grass). **American Journal of Botany**, v. 72, p. 1908-1913, 1985.

LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. An improved protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from mature zygotic embryos. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 118, p. 485-496, 2014.

LUNA, J. R. H.; SÁNCHEZ HINOJOSA, V. M.; IDROVO, N. A. S.; BUSTAMANTE, J. F. G. Estudios histológicos del proceso de embriogénesis somática en palma Coco Cumbé (*Parajubaea cocoides* Burret) a partir de embriones cigóticos inmaduros. **Cultivos Tropicales**, v. 38, n. 2, p. 36-44, 2017.

MAGALHÃES, H. M.; LOPES, P. S. N.; RIBEIRO, L. M.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; OLIVEIRA, D. M. T. Structure of the zygotic embryos and seedlings of *Butia capitata* (Arecaceae). **Trees**, v. 27, p. 273-283, 2013.

MAGNANI, E.; JIMÉNEZ-GÓMEZ, J. M.; SOUBIGOU-TACONNAT, L.; LEPINIEC, L.; FIUME, E. Profiling the onset of somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. **BMC Genomics**, v. 18, n. 998, 2017.

MAHDAVI-DARVARI, F.; NOOR, N. M.; ISMANIZAN, I. Epigenetic regulation and gene markers as signals of early somatic embryogenesis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 120, n. 2, p. 407-422, 2014.

MAHESWARAN, B.; WILLIAMS, E. S. Origin and development of somatic embryoids formed directly on immature embryos of *Trifolium repens* *in vitro*. **Annals of Botany**, v. 56, p. 619-630, 1985.

MANSFIELD, G.; BRIARTY, L. G. The dynamics of seedling and cotyledon cell development in *Arabidopsis thaliana* during reserve mobilization. **International Journal of Plant Sciences**, v. 157, p. 280-295, 1996.

MAZRI, M. A.; BELKOURA, I.; PLIEGO-ALFARO, F.; BELKOURA, M. Somatic embryogenesis from leaf and petiole explants of the Moroccan olive cultivar Dabhia. **Scientia Horticulturae**, v. 159, p. 88-95, 2013.

MERKLE, S. A.; PARROTT, W. A.; WILLIAMS, E. G. Applications of somatic embryogenesis and embryo cloning. In: BHOJWANI, S. S. (Ed.). **Plant Tissue Culture: Applications and Limitations**. Amsterdam: Elsevier, 1990. p. 67-101.

MICHAUX-FERRIÈRE, N.; GROUT, H.; CARRON, M. P. Origin and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae). **American Journal of Botany**, v. 79, n. 2, p. 174-180, 1992.

MIKULA, A.; TYKARSKA, T.; ZIELINSKA, M.; KURAS, M.; RYBCZYNSKI, J. J. Ultrastructural changes in zygotic embryos of *Gentiana punctata* L. during callus formation and somatic embryogenesis. **Acta Biologica Cracoviensia**, v. 46, p. 109-120, 2004.

MOON, H.-K.; LEE, H.; PAEK, K.-Y.; PARK, S.-Y. Osmotic stress and strong 2,4-D shock stimulate somatic-to-embryogenic transition in *Kalopanax septemlobus* (Thunb.) Koidz. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, n. 1710, 2015.

MOTOIKE, S. Y.; SARAIVA, E. A.; VENTRELLA, M. C.; SILVA, C. V.; SALOMÃO, L. C. C. Somatic embryogenesis of *Myrciaria aureana* (Brazilian grape tree). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 89, p. 75-81, 2007.

MOURA, E. F.; VENTRELLA, M. C.; MOTOIKE, S. Y. Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). **Scientia Agricola**, v. 67, p. 399-407, 2010.

MOURA, E. F.; VENTRELLA, M. C.; MOTOIKE, S. Y.; DE SÁ JUNIOR, 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, 175-184, 2008.

MUNISWAMY, B.; SREENATH, H. L. Effect of kanamycin on callus induction and somatic embryogenesis in cultured leaf tissues on *Coffea canephora* Pierre (Robusta). **Journal Coffee Research**, v. 26, n. 1, p. 44-51, 1996.

MÜNTZ, K. Developmental control of storage protein formation and its modulation by some internal and external factors during embryogenesis in plant seeds. **Biochemie und Physiologie der Pflanzen**, v. 182, p. 93-116, 1987.

MÜNTZ, K.; BELOZERSKY, M. A.; DUNAEVSKY, Y. E.; SCHLERETH, A.; TIEDEMANN, J. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 362, p. 1741-1752, 2001.

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

NAVARRO, B. V.; ELBL, P.; DE SOUZA, A. P.; JARDIM, V.; DE OLIVEIRA, L. F.; MACEDO, A. F.; SANTOS, A. L. W.; BUCKERIDGE, M. S.; FLOH, E. I. S. Carbohydrate-mediated responses during zygotic and early somatic embryogenesis in the endangered conifer, *Araucaria angustifolia*. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, 1-20, 2017.

NAZ, S.; ALI, A.; IQBAL, J. Phenolic content *in vitro* cultures of chick pea (*Cicer arietinum* L.) during callogenesis and organogenesis. **Pakistan Journal of Botany**, v. 40, n. 6, p. 2525-2539, 2008.

NAZÁRIO, P.; FERREIRA, S. A. N.; LIMA E BORGES, E. E.; GENOVESE-MARCOMINI, P. R.; MENDONÇA, M. S. Anatomical and histochemical aspects of the peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) seed. **Journal of Seed Science**, v. 35, n. 2, p. 171-178, 2013.

NDOUMOU, D. O.; NDZOMO, G. T.; NIEMENAK, N. Phenol content, acidic peroxidase and IAA-oxidase during somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* L. **Biologia Plantarum**, v. 39, n. 3, p. 337-347, 1997.

NEVES, S. C.; RIBEIRO, L. M.; CUNHA, I. R. G.; PIMENTA, M. A. S.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; LOPES, P. S. N. Diaspore structure and germination ecophysiology of the babassu palm (*Attalea vitrivir*). **Flora**, v. 208, p. 68-78, 2013.

NIC-CAN, G. I.; GALAZ-ÁVALOS, R. M.; DE-LA-PEÑA, C.; ALCAZAR-MAGAÑA, A.; WROBEL, K.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Somatic embryogenesis: identified factors that lead to embryogenic repression. A case of species of the same genus. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1-21, 2015.

NIC-CAN, G. I.; LOYOLA-VARGAS, V. M. The role of the auxins during somatic embryogenesis. In: LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. (Eds.). **Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications**. Springer: Switzerland, 2016. p. 171-182.

NOWAK, K.; GAJ, M. D. Stress-related function of bHLH109 in somatic embryo induction in *Arabidopsis*. **Journal of Plant Physiology**, v. 193, p. 119-126, 2016.

O'BRIEN T. P.; MCCYLLY, M. E. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Melbourne: Termarcarphi PTY. LTD, 1981.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCYLLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, p. 368-373, 1964.

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. Morpho-histological, histochemical, and molecular evidences related to cellular reprogramming during somatic embryogenesis of the model grass *Brachypodium distachyon*. **Protoplasma**, p. 1-18, 2017.

OLIVEIRA, N. C. C.; LOPES, P. S. N.; RIBEIRO, L. M.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; OLIVEIRA, L. A. A.; SILVÉRIO, F. O. Seed structure, germination, and reserve mobilization in *Butia capitata* (Arecaceae). **Trees**, v. 27, p. 1633-1645, 2013.

- OTHMANI, A. C.; BAYOUDH, C.; DRIRA, N.; MARRAKCHI, M.; TRIFI, M. 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**, v. 97, p. 71-79, 2009.
- PAN, X.; YANG, X.; LIN, G.; ZOU, R.; CHEN, H.; SAMAJ, J.; XU, C. Ultrastructural changes and the distribution of arabinogalactan proteins during somatic embryogenesis of banana (*Musa* spp. AAA cv. 'Yueyoukang 1'). **Physiologia Plantarum**, v. 142, p. 372-389, 2011.
- PANZA, V.; LÁINEZ, V.; MALDONADO, S. Seed structure and histochemistry in the palm *Euterpe edulis*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 145, p. 445-453, 2004.
- PEARSE, A. G. E. **Histochemistry: theoretical and applied**. London: Churchill, 1972.
- PEDROSO, M. C.; PAIS, M. S. A scanning electron microscopy and X ray microanalysis study during induction of morphogenesis in *Camellia japonica* L. **Plant Science**, v. 87, p. 99-108, 1992.
- PERNOLLET, J.-C. Protein bodies of seeds: Ultrastructure, biochemistry, biosynthesis and degradation. **Phytochemistry**, v. 17, p. 1473-1480, 1978.
- PETRÁŠEK, J.; FRIML, J. Auxin transport routes in plant development. **Development**, v. 136, p. 2675-2688, 2009.
- PILARSKA, M.; MALEC, P.; SALAJ, J.; BARTNICKI, F.; KONIECZNY, R. High expression of SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE coincides with initiation of various developmental pathways in *in vitro* culture of *Trifolium nigrescens*. **Protoplasma**, v. 253, n. 2, p. 345-55, 2016.
- PINTO, G.; SILVA, S.; NEVES, L.; ARAÚJO, C.; SANTOS, C. Histocytological changes and reserve accumulation during somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus*. **Trees**, v. 24, p. 763-769, 2010.
- PLATA, E.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, A. M. An anatomical study of secondary embryogenesis in *Camellia reticulata*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 27, p. 183-189, 1991.
- POPIELARSKA-KONIECZNA, M.; KOZIERADZKA-KISZKURNO, M.; ŚWIERCZYŃSKA, J.; GÓRALSKI, G.; ŚLESIAK, H.; BOHDANOWICZ, J. Are extracellular matrix surface network components involved in signalling and protective function? **Plant Signaling & Behavior**, v. 3, n. 9, p. 707-709, 2015.
- PROFUMO, P.; GASTALDO, P.; RASCIO, N. Ultrastructural study of different types of callus from leaf explants of *Aesculus hippocastanum* L. **Protoplasma**, v. 138, p. 89-97, 1987.

PUIGDERRAJOLS, P.; MIR, G.; MOLINAS, M. Ultrastructure of early secondary embryogenesis by multicellular and unicellular pathways in cork oak (*Quercus suber* L.). **Annals of Botany**, v. 87, p. 179-189, 2001.

QUIROZ-FIGUEROA, F.; ROJAS-HERRERA, R.; GALAZ-AVALOS, R. M.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Embryo production through SE can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 86, p. 285-301, 2006.

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, E.; BATISTA, M. T.; CANHOTO, J. M. Effect and analysis of phenolic compounds during somatic embryogenesis induction in *Feijoa sellowiana* Berg. **Protoplasma**, v. 232, p. 193-202, 2008.

RIBEIRO, L. M.; OLIVEIRA, D. M. T.; GARCIA, Q. S. Structural evaluations of zygotic embryos and seedlings of the macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae) during *in vitro* germination. **Trees**, v. 26, p. 851-863, 2012.

ROCHA, D. I. R.; PINTO, D. L. P.; VIEIRA, L. M.; TANAKA, F. A. O.; DORNELAS, M. C.; OTONI, W. C. Cellular and molecular changes associated with competence acquisition during passion fruit somatic embryogenesis: ultrastructural characterization and analysis of SERK gene expression. **Protoplasma**, v. 253, n. 2, p. 595-609, 2016.

ROCHA, D. I.; VIEIRA, L. M.; TANAKA, F. A. O.; SILVA, L. C.; OTONI, W. C. Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. **Protoplasma**, v. 249, p. 747-758, 2012.

RODRIGUES, J. K.; MENDONÇA, M. S.; GENTIL, D. F. O. Aspectos biométricos, morfoanatômicos e histoquímicos do pirênio de *Bactris maraja* (Arecaceae). **Rodriguésia**, v. 66, n. 1, p. 075-085, 2015.

RODRIGUEZ, A. P. M.; WETZSTEIN, H. Y. A morphological and histological comparison of the initiation and development of pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryogenic cultures induced with naphthaleneacetic acid or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Protoplasma**, v. 204, p. 71-83, 1998.

ROGGE-RENNER, G. D.; STEINER, N.; SCHMIDT, E. C.; BOUZON, Z. L.; FARIAS, F. L.; GUERRA, M. P. Structural and component characterization of meristem cells in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze zygotic embryo. **Protoplasma**, v. 250, p. 731-739, 2013.

ROSE, R. J. Genetic reprogramming of plant cells *in vitro* via dedifferentiation or pre-existing stem cells. In: ROSE, R. J. (Ed.). **Molecular cell biology of the growth and differentiation of plant cells**. Boca Raton: CRC Press, 2016. p. 320-339.

ROSE, R. J.; WANG, X. D.; NOLAN, K. E.; ROLFE, B. G. Root meristems in *Medicago truncatula* tissue culture arise from vascular-derived procambial-like cells in a process regulated by ethylene. **Journal of Experimental Botany**, v.57, n. 10, p.

2227-2235, 2006.

SALAJOVÁ, T.; SALAJ, J. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cotyledon explants isolated from emblings and seedlings of hybrid firs. **Journal of Plant Physiology**, v. 158, p. 747-755, 2001.

SAMAJ, J.; BALUSKA, F.; BOBÁK, M.; VOLKMANN, D. Extracellular matrix surface network of embryogenic units of friable maize callus contains arabinogalactan-proteins recognized by monoclonal antibody JIM4. **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 369-374, 1999.

SANÉ, D.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; GASSAMA-DIA, Y. K.; SAGNA, M.; TROUSLOT, M. F.; DUVAL, Y.; BORGEL, A. Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). **Annals of Botany**, v. 98, p. 301-308, 2006.

SANTOS, A. V. P.; CUTTER, E. G.; DAVEY, M. R. Origin and development of somatic embryos in *Medicago sativa* L. (Alfalfa). **Protoplasma**, v. 117, p. 107-115, 1983.

SARASAN, V.; RAMSAY, M. M.; ROBERTS, A.V. *In vitro* germination and induction of direct somatic embryogenesis in 'Bottle Palm' [*Hyophorbe lagenicaulis* (L. Bailey) H.E. Moore], a critically endangered Mauritian palm. **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 1107-1111, 2002.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; GUEDES, R. S.; DA 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.

SCHNABLOVÁ, R.; SYNKOVÁ, H.; VIČÁNKOVÁ, A.; BURKETOVÁ, L.; EDER, J.; CVIKROVÁ, M. Transgenic *ipt* tobacco overproducing cytokinins over accumulates phenolic compounds during *in vitro* growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, p. 526-534, 2006.

SCHUMANN, G.; RYSCHKA, U.; SCHULZE, J.; KLOCKEL, E. Anatomy of Somatic Embryogenesis. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry: Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed**. Berlin: Springer – Verlag, 1995. p. 71-86.

SCHWENDIMAN, J.; PANNETIER, C.; N. MICHAUX-FERRIERE. Histology of Somatic Embryogenesis from Leaf Explants of the Oil Palm *Elaeis guineensis*. **Annals of Botany**, v. 62, n. 1, p.43-52, 1988.

SELDIMIROVA, O. A.; KRUGLOVA, N. N. Properties of the initial stages of embryoidogenesis *in vitro* in wheat calli of various origin. **Plant Physiology**, v. 40, n. 5, p. 447-454, 2013.

SELDIMIROVA, O. A.; KRUGLOVA, N. N.; TITOVA, G. E.; BATYGINA, T. B. Comparative ultrastructural analysis of the *in vitro* microspore embryoids and *in vivo*

zygotic embryos of wheat as a basis for understanding of cytophysiological aspects of their development. **Russian Journal of Developmental Biology**, v. 48, n. 3, p. 185-197, 2017.

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

SIDKY, R. A.; ELDAWYATI, M. M. Proliferation of female inflorescences explants of date palm. **Annals of Agricultural Science**, v. 57, n. 2, p. 161-165, 2012.

SILVA, G. M.; CRUZ, A. C. F.; OTONI, W. C.; PEREIRA, T. N. S.; ROCHA, D. I.; SILVA, M. L. Histochemical evaluation of induction of somatic embryogenesis in *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 51, n. 5, p. 539-545, 2015.

SILVA, M. L.; PINTO, D. L. P.; GUERRA, M. P.; FLOH, E. I. S.; BRUCKNER, C. H.; OTONI, W. C. Novel regeneration system for a wild passion fruit species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 99, p. 47-54, 2009.

SILVA, R. S.; RIBEIRO, L. M.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; NUNES, Y. R. F.; LOPES, P. S. N. Seed structure and germination in buriti (*Mauritia flexuosa*) - the swamp palm. **Flora**, v. 209, n. 11, p. 674-685, 2014.

SIVANESAN, I.; LIM, M. Y.; JEONG, B. R. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf and petiole explants of *Campanula punctata* Lam. var. *rubriflora* Makino. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 107, p. 365-369, 2011.

SMITH, S. M.; DENYER, K. Primary products/starch. In: BRIAN, T. (Ed.), **Encyclopedia of applied plant sciences**. Oxford: Elsevier, 2003. p. 896-905.

STEIN, V. C.; PAIVA, R.; VARGAS, D. P.; SOARES, F. P.; ALVES, E.; NOGUEIRA, G. F. Ultrastructural calli analysis of *Inga vera* Willd. subsp. *Affinis* (DC.) T.D. PENN. **Revista Árvore**, v. 34, n. 5, p. 789-796, 2010.

STEINER, N.; FARIAS-SOARES, F. L.; SCHMIDT, E. C.; PEREIRA, M. L. T.; SCHEID, B.; ROGGE-RENNER, G. D.; BOUZON, Z. L.; SCHMIDT, D.; MALDONADO, S.; GUERRA, M. P. Toward establishing a morphological and ultrastructural characterization of proembryogenic masses and early somatic embryos of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Protoplasma**, v. 253, n. 2, p. 487-50, 2016.

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

STEINMACHER, D. A.; GUERRA, M. P.; SAARE-SURMINSKI, K.; LIEBEREI, R. A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, v. 108, n. 8, p. 1463-1475, 2011.

- STRZAŁKA, K.; HARA-NISHIMURA, I.; NISHIMURA, M. Changes in physical properties of vacuolar membrane during transformation of protein bodies into vacuoles in germinating pumpkin seeds. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1239, p. 103-110, 1995.
- SU, Y. H.; ZHAO, X. Y.; LIU, Y. B.; ZHANG, C. L.; O'NEILL, S. D.; ZHANG, X. S. Auxin-induced WUS expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 59, p. 448-460, 2009.
- SYUHADA, W. N.; RASID, O. A.; PARVEEZ, G. K. A. Evaluation on the effects of culture medium on regeneration of oil palm plantlets from immature embryos (ie), **Journal of Oil Palm Research**, v. 28, n. 2, p. 234-239, 2016.
- TAO, L.; YANG, Y.; WANG, Q.; YOU, X. Callose deposition is required for somatic embryogenesis in plasmolyzed *Eleutherococcus senticosus* zygotic embryos. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 14115-14126, 2012.
- TESTILLANO, P. S.; RISUEÑO, M. C. Tracking gene and protein expression during microspore embryogenesis by confocal laser scanning microscopy. In: TOURAEV, A.; FORSTER, B. P.; JAIN, S. M. (Eds). **Advances in haploid production in higher plants**. Heidelberg: Springer-Verlag, 339-347, 2009.
- TISSERAT, B. Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in vitro. **Journal of Experimental Botany**, v. 30, n. 119, p. 1275-1283, 1979.
- VAN MEER, G.; VOELKER, D. R.; FEIGENSON, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 2, p. 112-24, 2008.
- VASIL, V.; LU, C.-Y.; VASIL, I. K. Histology of somatic embryogenesis in cultured immature embryos of maize (*Zea mays* L.). **Protoplasma**, n. 127, p. 1-8, 1985.
- VASIL, V.; VASIL, I. K. The ontogeny of somatic embryos of *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. I. in cultured immature embryos. **Botanical Gazette**, v. 143, n. 4, p. 454-465, 1982.
- VERDEIL, J. L.; ALEMANNI, L.; NIEMENAK, N.; TRAMBARGER, T. J. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? **Trends in Plant Science**, v. 12, p. 245-252, 2007.
- VERDEIL, J. L.; HOCHER, V.; HUET, C.; GROSDÉMANGE, F.; ESCOUTE, J.; FERRIERE, N.; NICOLE, M. Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence. **Annals of Botany**, v. 88, p. 9-18, 2001.
- VERDUS, M.-C.; DUBOIS, T.; DUBOIS, J.; VASSEUR, J. Ultrastructural changes in leaves of *Cichorium* during somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, v. 72, p. 375-383, 1993.
- VIDAL, B. C. Dichroism in collagen bundles stained with xylydine-Ponceau 2R. **Annales d'Histochemie**, v. 15, p. 289-296, 1970.

VIEITEZ, A. M. Somatic embryogenesis in *Camellia* spp. In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWTON, R. J. (Eds.). **Somatic embryogenesis in woody plants. Volume 2 – Angiosperms**. Dordrecht: Springer, 1995. p. 358-375.

VOGEL, G. What don't we know? How Does a Single Somatic Cell Become A Whole Plant? **Science**, v. 309, p. 1, 2005.

VOLPERT, R.; OSSWALD, W.; ELSTNER, E. F. Effects of cinnamic acid derivatives on indole acetic acid oxidation by peroxidase. **Phytochemistry**, v. 38, n. 1, p. 19-22, 1995.

VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHOKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 233-249. 2002.

VRIES, S. C.; BOOIJ, H.; MEYERINK, P.; HUISMAN, G.; WILDE, H. D.; THOMAS, T. L.; VAN KAMMEN, A. Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension cultures. **Planta**, v. 176, p. 196-204, 1988.

VRIES, S. C.; WEIJERS, D. Plant embryogenesis. **Current Biology**, v. 27, p. 870-873, 2017.

VUJICIC, R.; RADOJEVIC, L.; NESKOVIC, M. Regular alignment of membrane ribosomes in embryogenic tissue of *Paulownia tomentosa*. **Z. Pflanzenphysiol.**, v. 91, p. 53±56, 1979.

WEST, M. A.; HARADA, J. Embryogenesis in higher plants: an overview. **The Plant Cell**, v. 5, p. 1361-1369, 1993.

WILLIAMS, E. S.; MAHESWARAN, B. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, v. 57, p. 443-462, 1986.

WIŚNIEWSKA, M.; ŁOTOCKA, B.; SUCHORSKA-TROPIŁO, K.; DĄBROWSKA, B. Embryo ultrastructure in *Origanum majorana* L.(Lamiaceae) after seed conditioning. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, v. 48, n. 2, p. 105-116, 2006.

WOODENBERG, W. R.; BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W.; FARRANT, J. M. Development of cycad ovules and seeds. 2. Histological and ultrastructural aspects of ontogeny of the embryo in *Encephalartos natalensis* (Zamiaceae). **Protoplasma**, v. 251, n. 4, p. 797-816, 2013.

YANG, X. Y.; ZHANG, X. L. Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 29, n. 1, p. 36-57, 2010.

YEUNG, E. C. **Structural and development patterns in somatic embryogenesis**. In: THORPE, T. A. (Ed). *In vitro* Embryogenesis in Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1995, p. 205-248.

- YEUNG, E. C. The use of histology in the study of plant tissue culture systems-some practical comments. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 35, p. 137-143, 1999.
- YEUNG, E. C.; RAHMAN, M. H.; THORPE, T. A. comparative development of zygotic and microspore-derived embryos in *Brassica napus* L. Cv Topas. 1. Histodifferentiation. **International Journal of Plant Sciences**, v. 157, p. 27-39, 1996.
- YOU, X. L.; YI, J. S.; CHOI, Y. E. Cellular change and callose accumulation in zygotic embryos of *Eleutherococcus senticosus* caused by plasmolyzing pretreatment result in high frequency of single-cell-derived somatic embryogenesis. **Protoplasma**, v. 227, p. 105-112, 2006.
- YUSOFF, N. F. M.; ALWEE, S. S. R. S.; ABDULLAH, M. O.; CHAI-LING, H.; NAMASIVAYAM, P. A time course anatomical analysis of callogenesis from young leaf explants of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Journal of Oil Palm Research**, v. 24, p. 1330-1341, 2012.
- ZAVALIEV, R.; UEKI, S.; EPEL, B. L.; CITOVSKY, V. Biology of callose (β -1,3-glucan) turnover at plasmodesmata. **Protoplasma**, v. 248, p. 117-130, 2011.
- ZAYED, E. M. M.; ABD ELBAR, O. H. Morphogenesis of immature female inflorescences of date palm *in vitro*. **Annals of Agricultural Science**, v. 60, n. 1, p. 113-120, 2015.
- ZAYED, E. M. M.; ZEIN EL DIN, A. F. M.; MANAF, H. H.; ABDELBAR, O. H. Floral reversion of mature inflorescence of date palm *in vitro*. **Annals of Agricultural Science**, p. 1-9, 2016.
- ZEGZOUTI, R.; ARNOULD, M.-F.; FAVRE, J.-M. Histological investigation of the multiplication step in secondary somatic embryogenesis of *Quercus robur* L. **Annals of Forest Science**, v. 58, p. 681-690, 2001.
- ZHOU, C.; LIU, L.; LI, C. Microarray analysis of Siberian ginseng cyclic somatic embryogenesis culture systems provides insight into molecular mechanisms of embryogenic cell cluster generation. **PLOS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1-13, 2014.
- ZHOU, T.; YANG, X.; GUO, K.; DENG, J.; XU, J.; GAO, W.; LINDSEY, K.; ZHANG, X. ROS homeostasis regulates somatic embryogenesis via the regulation of auxin signaling in cotton. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 15, p. 2108-2124, 2016.
- ZIENKIEWICZ, A.; JIMÉNEZ-LÓPEZ, J. C.; ZIENKIEWICZ, K.; ALCHÉ, J. D.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I. Development of the cotyledon cells during olive (*Olea europaea* L.) *in vitro* seed germination and seedling growth. **Protoplasma**, v. 248, p. 751-765, 2011.
- ZIENKIEWICZ, A.; ZIENKIEWICZ, K.; REJÓN, J. D.; ALCHÉ, J. D.; CASTRO, A. J.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I. Olive seed protein bodies store degrading enzymes

involved in mobilization of oil bodies. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 1, p. 103-115, 2014.

CAPÍTULO III

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE GUEROBA [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES DE PLANTAS *IN VITRO*

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE GUEROBA [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES DE PLANTAS *IN VITRO*

RESUMO

Neste trabalho objetivou-se induzir a embriogênese somática e a regeneração de plantas de gueroaba [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] a partir de segmentos foliares de plantas germinadas *in vitro* pela técnica *Thin Cell Layer* (TCL). Adicionalmente, análises anatômicas e histoquímicas foram realizadas durante o processo. Para tanto, em explantes variando entre 1 e 2 mm de espessura, os efeitos dos pré-tratamentos (regimes de incubação das plantas fornecedoras dos explantes – em luz e escuro) e das auxinas ácido 4-amino-3, 5, 6-tricloropicolínico (Picloram) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (450 µM) foram testados na indução de calos e formação de embriões somáticos. Em seguida, realizou-se um novo experimento para verificar o efeito das poliaminas Putrescina e Espermidina combinadas em diferentes concentrações na indução de calos, assim como o efeito de 6-benzilaminopurina (BAP) (0, 6 e 12 µM) na diferenciação dos embriões somáticos. Verificou-se que os pré-tratamentos das plantas fornecedoras dos explantes em condição de luz ou escuro não promoveram diferenças significativas nas respostas obtidas. As auxinas foram igualmente eficientes em termos estatísticos para a formação de calos primários (taxa média de produção de 37,9%) e, de maneira geral, a região meristemática e as regiões mais basais da parte aérea foram as que exibiram maior produção de calos primários do que às demais regiões testadas. Calos embriogênicos, assim como embriões somáticos, foram visualizados somente nos tratamentos com Picloram, independente dos pré-tratamentos adotados e, de modo geral, os embriões somáticos obtidos exibiram anormalidades no processo germinativo. As poliaminas não foram decisivas na formação de calos primários e embriogênicos, assim como o BAP não foi decisivo para a diferenciação de embriões somáticos. Em adição, a permanência de calos em meio suplementado com poliaminas promoveu a perda das características embriogênicas em alguns destes, que se tornaram amorfos e aquosos. O processo germinativo de embriões somáticos provenientes do experimento do efeito de poliaminas foi lento e assincrônico, limitando-se ao alongamento do pecíolo cotiledonar. A origem dos calos, de maneira geral, foi relacionada aos tecidos vasculares e hipotetiza-se a ocorrência de embriões somáticos de ambas origens, uni e multicelular em um mesmo sistema embriogênico.

Palavras-chaves: Arecaceae; TCL; auxinas; poliaminas; embriões somáticos.

SOMATIC EMBRYOGENESIS AND PLANT REGENERATION IN GUEROBA [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] FROM *IN VITRO* PLANT SEGMENTS

ABSTRACT

The objective of this work was to induce somatic embryogenesis and plant regeneration in gueroba [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] from leaf segments of *in vitro* germinated plants by Thin Cell Layer technique (TCL). In addition, anatomical and histochemical analyzes were performed during the process. To do so, in explants varying between 1 and 2 mm thick, the effects of pre-treatments (incubation regimes of the plants that provided the explants - in light and dark) and auxins 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid (Picloram) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (450 μM) were tested for callus induction and somatic embryos formation. Then, a new experiment was carried out to verify the effect of putrescine and spermidine combined at different concentrations on callus induction, as well as the effect of 6-benzylaminopurine (BAP) (0, 6 and 12 μM) on somatic embryo differentiation. It was found that the pre-treatments of the plants that provided the explants in light or dark conditions did not promote significant differences in the obtained responses. The auxins were equally efficient in statistical terms for the formation of primary calli (37.9% average) and, in general, the meristematic and basal regions of the aerial part of the plants showed higher primary callus formation than the other regions tested. Embryogenic calluses, as well as somatic embryos, were visualized only in the treatments with Picloram, regardless of the pre-treatments adopted and, in general, the somatic embryos obtained exhibited abnormalities in the germinative process. Polyamines were not decisive in the formation of primary and embryogenic calli, as well as BAP was not decisive for the differentiation of somatic embryos. In addition, calli permanence in medium supplemented with polyamines promoted loss of embryogenic characteristics in some of these, which became amorphous and aqueous. The germination process of somatic embryos from the experiment using polyamines was slow and asynchronous, limiting to the elongation of the cotyledonary petiole. In general, calli origin was related to vascular tissues and the occurrence of somatic embryos of both origins, uni and multicellular in the same embryogenic system is hypothesized.

Keywords: Arecaceae; TCL; auxins; polyamines; somatic embryos.

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE GUEROBA *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc. A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES DE PLANTAS *IN VITRO*

1. INTRODUÇÃO

Protocolos para embriogênese somática de palmeiras vêm sendo desenvolvidos a partir de diversas fontes de explantes e têm proporcionado diferentes graus de sucesso. Apesar dos importantes avanços já obtidos, ainda se faz necessária a otimização destes protocolos para viabilizar sua aplicação comercial em diferentes espécies de palmeiras, o que exige melhor compreensão dos vários eventos (morfológicos, anatômicos, ultraestruturais e moleculares) subjacentes à rota. Nesse contexto, a *transverse Thin Cell Layer* (sigla em inglês tTCL), sistema caracterizado pelo uso de explantes de tamanho reduzido provenientes da excisão transversal de diferentes órgãos de plantas (0,2/0,5 mm ou alguns mm de espessura) (TRAN THANH VAN, 2003), se configura como uma alternativa à indução da rota embriogênica e à elucidação desses eventos. A excisão dos explantes via TCL promove o rompimento dos domínios simpláticos celulares (STEINMACHER *et al.*, 2007), o que modula as respostas *in vitro*.

Segundo Tran Thanh Van (2003), o sistema TCL, inicialmente reportado em *Nicotiana tabacum* (TRAN THANH VAN, 1973a, b) com o objetivo de manipular a regeneração de órgãos específicos, apresenta alto potencial de neoformação de embriões somáticos a partir de um número reduzido de células. Esse sistema é altamente influenciado pelo estado genético e requisitos epigenéticos das camadas de células ou tecidos isolados e por diversas condições de crescimento, como reguladores de crescimento, luz, temperatura e outros (SILVA; NHUT, 2003). Silva e Dobránszki (2015) salientam que independente dos fatores abióticos manipulados e com base em dois conceitos recentes - Fator de Correção de Crescimento (SILVA; DOBRÁNSZKI, 2011, 2014) e Fator Geométrico (SILVA; DOBRÁNSZKI, 2014), a alta produtividade proporcionada pelo sistema de TCL em comparação aos explantes com tamanhos convencionais (maiores).

Em função do menor número de células envolvidas no processo, dado o tamanho dos explantes, o sistema possibilita a localização relativamente rápida das células responsivas *in vitro*, bem como a investigação dos processos subjacentes à desdiferenciação celular, subsequente ou não, à aquisição de totipotência. Essa técnica

também pode ser utilizada para aumentar o número de clones de genótipos de interesse, já obtidos por embriogênese somática, mediante reclonagem via TCL. Além do mais, possibilita a clonagem de materiais obtidos a partir de polinização controlada entre genótipos comerciais selecionados (como por exemplo, a utilização como fontes de explantes de tecidos foliares oriundos de embriões zigóticos germinados *in vitro*), o que pode subsidiar programas de melhoramento genético. Ademais, o sistema se destaca devido às vantagens da alta frequência e curto intervalo de tempo para ocorrência da embriogênese somática (BUI VAN LE *et al.*, 1997) e da exigência de pequena quantidade de material vegetal e de meio de cultura (SILVA *et al.*, 2007).

A aplicação da TCL tem sido relatada em um número relativamente limitado de palmeiras visando à embriogênese somática, como *Bactris gasipaes* (STEINMACHER *et al.*, 2007; BETTENCOURT *et al.*, 2016), *Cocos nucifera* (SAMOSIR *et al.*, 1998), *Elaeis guineensis* (SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2010; GUEDES *et al.*, 2011; BONETTI *et al.*, 2016) e *Acrocomia aculeata* (PADILHA *et al.*, 2015), utilizando, sobretudo, lâminas foliares e inflorescências como fontes de explantes. Para *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc. (gueroba), espécie de importância econômica para região central do Brasil, até a presente data, não há nenhum relato do uso da técnica.

Dentro desse contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar os eventos envolvidos na embriogênese somática de gueroba [*S. oleracea* (Mart.) Becc.], especialmente sob o efeito de diferentes reguladores de crescimento, aplicando-se o sistema *Thin Cell Layer* à parte aérea de plantas germinadas *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), situado em Brasília-DF.

2.1 Experimento 1: Influência dos pré-tratamentos e reguladores de crescimento na indução de calos, formação de embriões somáticos e regeneração de plantas de gueroaba

2.1.1 Obtenção dos explantes

Plântulas provenientes da germinação *in vitro* de embriões zigóticos de gueroaba (*Syagrus oleracea*) foram utilizadas como fonte de explantes. Para a obtenção dos embriões zigóticos, sementes foram extraídas de frutos em estágio fisiológico maduro, caracterizado por epicarpo com coloração verde-amarelo a amarelado e mesocarpo amarelado com consistência macia. Os frutos foram coletados de plantas adultas (matrizes previamente selecionadas, com bom estado fitossanitário e alta produtividade) de populações localizadas no município de Itaberaí, Goiás, Brasil (Coordenadas 16°4'28.12" S e 49°43'18.08" O) (Anexo 1).

Após a coleta, os frutos foram secos à sombra (à temperatura ambiente), por 60 dias, e, para a extração da semente do seu interior, se utilizou um torno de bancada. Os frutos apresentavam um teor médio de 4% de umidade, determinado pelo método de estufa a 105 °C por 24 horas (BRASIL, 2009).

A desinfestação das sementes foi realizada em câmara de fluxo laminar, por imersão em álcool etílico 70% (v/v), durante cinco minutos, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) (2,5% de cloro ativo) por 40 minutos. Três sucessivas lavagens foram realizadas em água destilada e autoclavada, por um minuto cada, para retirar o excesso de NaOCl. Logo depois, em condições assépticas, as sementes foram seccionadas e os embriões isolados com auxílio de um bisturi, alicate dentário e uma pinça de ponta fina.

Na etapa de germinação, os embriões zigóticos maduros foram inoculados em meio de cultura básico de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose e submetidos a dois regimes de incubação dos explantes em sala de crescimento à 25 ± 2°C, com e sem disponibilidade de luz. Os tubos, sob

disponibilidade de luz, foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz e luminosidade de $50 \mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

2.1.2 Indução de calos

Após a germinação dos embriões zigóticos, as 40 plantas obtidas (20 plantas clorofiladas – incubadas sob disponibilidade de luz e 20 plantas aclorofiladas – incubadas sem disponibilidade de luz), com pelo menos 5 cm de altura, tiveram as raízes (quando presentes) e o cotilédone (haustório) removidos. A parte aérea, contendo o meristema apical e bainha foliar (catafilo), foi seccionada transversalmente em segmentos, com comprimento variando entre um e dois milímetros (Figura 1). Padronizaram-se 15 segmentos por planta (Figura 2A), partindo da região meristemática. O primeiro explante foi composto por meristema apical e fragmentos de bainha foliar e os demais por fragmentos de bainha foliar e eventuais eofilos. A posição original dos explantes foi mantida na placa de *Petri* durante cultivo.



Figura 1. Esquema para a obtenção de explantes de plantas de gueroba [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] cultivadas *in vitro*.

Os segmentos obtidos foram inoculados em meio basal composto pelos sais de Y3 (EEUWENS, 1976). A fonte de Fe-EDTA e vitaminas foi mantida de acordo com a concentração original do meio de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). O meio foi suplementado com auxinas ácido 4-amino-3, 5, 6-tricloropicolínico (Picloram) ou ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (450 μM), 0,5 g.L^{-1} de glutamina, 30 g.L^{-1} de sacarose, 2,5 g.L^{-1} de carvão ativado e o pH foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da adição do agente gelificante (2,5 g.L^{-1} de *Phytigel* - Sigma, St. Louis, MO). Os meios foram esterilizados por autoclavagem à 121 °C durante 20 minutos à 1,5 atm de pressão.

Durante a fase de indução, os explantes foram cultivados em placas de *Petri* (15 x 90 mm), com aproximadamente 25 mL de meio de cultura por placa, seladas com filme policloreto de polivinila (PVC) transparente e armazenadas em sala de crescimento escura à $25^\circ \pm 2^\circ\text{C}$.

Os subcultivos foram realizados mensalmente e a percentagem de explantes oxidados (tecidos totalmente escurecidos) e a percentagem de explantes com formação de calo primário (sem considerar a quantidade e a qualidade do calo) foram determinadas aos 90 dias, enquanto que a percentagem de calos embriogênicos (capazes de formar embriões somáticos) foi determinada aos 240 dias. A percentagem de explantes oxidados foi obtida através da razão entre a quantidade de explantes oxidados e o número total de explantes por placa, multiplicada por 100. A percentagem de explantes com calo primário foi calculada da mesma forma supracitada, já a percentagem de calos embriogênicos foi calculada com base no número inicial de calos primários.

2.1.3 Diferenciação de embriões somáticos

Após 240 dias em meio de indução, os calos obtidos foram transferidos para meio com concentração reduzida dos reguladores, preservando o meio básico original. Por 90 dias, os calos permaneceram em meio suplementado com 40 μM de Picloram e 40 μM de 2,4-D, separadamente. Em seguida, a concentração de ambas auxinas foi reduzida para 4,52 μM , 0,45 μM e 0,045 μM por 90, 90 e 60 dias, respectivamente. Os processos de gelificação do meio, ajuste do pH e autoclavagem foram os mesmos mencionados no tópico 2.1.2.

Nesse estágio, os agregados embriogênicos foram cultivados em placas de *Petri* (20 x 100 mm), contendo aproximadamente 25 mL de meio de cultura por placa, seladas com filme PVC transparente e armazenadas em sala de crescimento escura à $25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$.

Os subcultivos foram realizados mensalmente e o número de embriões somáticos por explante foi determinada aos 240 dias em meio de diferenciação.

2.1.4 Regeneração de plantas

Nesse estágio, visando o completo desenvolvimento dos embriões somáticos e início da germinação (desenvolvimento de radícula e parte aérea), os explantes com embriões somáticos diferenciados foram transferidos para o meio básico original Y3 (EEUWENS, 1976) desprovido de reguladores de crescimento, com adição de Fe-EDTA e vitaminas de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 30 g.L^{-1} de sacarose, $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de glutamina e $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de carvão ativado. Os processos de gelificação do meio, ajuste do pH e autoclavagem foram os mesmos mencionados no tópico 2.1.2.

Os explantes foram cultivados em potes (5 x 10 cm), com aproximadamente 30 mL de meio de cultura, selados com filme PVC transparente e armazenados em sala de crescimento à temperatura de $25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$, luminosidade de $50 \mu\text{m.m}^2.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas.

Tabela 2. Composição dos meios de cultura e períodos de tempo (dias) usados no processo de embriogênese somática em gueroba (*Syagrus oleracea*) a partir de segmentos foliares *in vitro* sob efeito inicial de pré-tratamentos (incubação em luz e escuro)

Componentes	Indução de calos	Diferenciação de embriões somáticos				Regeneração de plantas
Meio de cultura	Y3	Y3	Y3	Y3	Y3	Y3
Vitaminas	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Glutamina (g.L ⁻¹)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Picloram (µM)	450	40	4,52	0,45	0,045	-
2,4-D (µM)	450	40	4,52	0,45	0,045	-
Sacarose (g.L ⁻¹)	30	30	30	30	30	30
<i>Phytigel</i> (g.L ⁻¹)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Carvão vegetal (g.L ⁻¹)	2,5	-	-	-	-	2,5
Períodos (dias)	240	90	90	90	60	90

2.1.5 Análises estatísticas

Para análise do efeito de pré-tratamentos e reguladores de crescimento na indução de calos e formação de embriões somáticos de gueroba a partir de segmentos foliares de plantas *in vitro*, adotou-se delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 3 (regimes de incubação x auxinas): fator regime de incubação em dois níveis (pré-tratamentos), plântulas incubadas sob disponibilidade de luz e em escuro, e fator auxina em três níveis, ausência de auxina, 450 µM Picloram e 450 µM 2,4-D, totalizando seis tratamentos. Cada tratamento foi composto por quatro repetições contendo 15 explantes (segmentos transversais) cada.

O conjunto de dados obtido foi submetido à análise de variância (ANOVA) e, quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de significância, por meio do software estatístico R (R CORE TEAM, 2015).

2.2 Experimento 2: Influência de poliaminas na indução de calos, formação de embriões somáticos e regeneração de plantas de gueroaba

2.2.1 Obtenção de explantes e indução de calos

Após a avaliação do uso dos pré-tratamentos e dos reguladores de crescimento na formação de calos e embriões somáticos, foi realizado um novo experimento para verificar o efeito das poliaminas Putrescina e Espermidina combinadas em diferentes concentrações.

Para este experimento, embriões zigóticos obtidos de sementes desinfestadas conforme tópico 2.1.1 foram inoculados em meio de cultura básico e mantidos em sala de crescimento à $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas de luz e luminosidade de $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. As plantas germinadas *in vitro* com pelo menos 5 cm de altura, tiveram as raízes (quando presentes) e o cotilédone (haustório) removidos. A parte aérea, contendo o meristema apical e bainha foliar, foi seccionada como mencionado no tópico 2.1.2. Padronizaram-se oito segmentos por planta, partindo da região meristemática.

Os segmentos obtidos foram inoculados em meio basal composto pelos sais de Y3 (EEUWENS, 1976). A fonte de Fe-EDTA e vitaminas foi mantida de acordo com a concentração original de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). O meio foi suplementado com $0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de glutamina, $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de sacarose, $2,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de carvão ativado, $450 \mu\text{M}$ de Picloram e poliaminas Putrescina (Put) e Espermidina (Esp) combinadas nas seguintes concentrações: $0 \mu\text{M}$ de Put e $0 \mu\text{M}$ de Esp, $0 \mu\text{M}$ de Esp + $500 \mu\text{M}$ de Put, $0 \mu\text{M}$ de Esp + $1000 \mu\text{M}$ de Put, $100 \mu\text{M}$ de Esp + $0 \mu\text{M}$ de Put, $100 \mu\text{M}$ de Esp + $500 \mu\text{M}$ de Put e $100 \mu\text{M}$ de Esp + $1000 \mu\text{M}$ de Put.

Os processos de gelificação do meio, ajuste do pH e autoclavagem foram os mesmos mencionados no tópico 2.1.2. As poliaminas foram inseridas no meio de cultura após filtragem (filtro de $0,22 \mu\text{m}$ Millipore®), após a autoclavagem do meio de cultura.

Durante a fase de indução, os explantes foram cultivados em placas de *Petri* (15 x 90 mm), com aproximadamente 25 mL de meio de cultura por placa, seladas com filme PVC transparente e armazenadas em sala de crescimento escura à $25^\circ \pm 2^\circ \text{C}$.

Os subcultivos foram realizados mensalmente e a percentagem de explantes oxidados (tecidos totalmente escurecidos) e a percentagem de explantes com formação de calo primário (sem considerar a quantidade e a qualidade do calo) foram

determinadas aos 90 dias e a percentagem de calos embriogênicos aos 210 dias. As percentagens foram calculadas segundo especificações do tópico 2.1.2.

2.2.2 Diferenciação de embriões somáticos

Após 210 dias em meio de indução, os calos obtidos foram transferidos para meio com concentração reduzida de Picloram (40 μM), preservando o meio básico original, além de 0,5 g.L^{-1} de cisteína e 0,5 g.L^{-1} de caseína hidrolisada, por um período de 30 dias. Em seguida, a concentração do Picloram foi reduzida para 20 μM , onde os explantes permaneceram por 90 dias e então, foram transferidos para meio desprovido de regulador de Picloram e acrescido de 100 μM de Espermidina, 1000 μM de Putrescina e 6-benzilaminopurina (BAP) nas seguintes concentrações: 0 μM , 6 μM e 12 μM . Os processos de gelificação do meio, ajuste do pH e autoclavagem foram os mesmos mencionados no tópico 2.1.2.

Nesse estágio, os agregados embriogênicos foram cultivados em placas de *Petri* (20 x 100 mm), contendo aproximadamente 25 mL de meio de cultura por placa, seladas com filme PVC transparente e armazenadas em sala de crescimento escura à $25^\circ \pm 2^\circ \text{C}$.

Os subcultivos foram realizados mensalmente e o número de embriões somáticos por explante foi determinada aos 150 dias em meio de diferenciação.

2.2.3 Regeneração de plantas

Nesse estágio, visando o completo desenvolvimento dos embriões somáticos e início da germinação (desenvolvimento de radícula e parte aérea), os explantes com embriões somáticos diferenciados foram transferidos para o meio básico utilizado na etapa anterior, desprovido de poliaminas e acrescido de 0,54 μM de ácido 1-naftalenoacético (ANA).

Após 60 dias no meio supracitado, os embriões somáticos foram transferidos para meio de cultura de MS “meia força” (½ de MS – 50% dos macronutrientes e micronutrientes), desprovido de reguladores de crescimento, suplementado com 30 g.L^{-1} de sacarose e 1,5 g.L^{-1} de carvão ativado. Os processos de gelificação do meio, ajuste do pH e autoclavagem foram os mesmos mencionados no tópico 2.1.2.

Os explantes foram cultivados em potes (5 x 10 cm), com aproximadamente 30 mL de meio de cultura, selados com filme PVC transparente e armazenados em sala de

crescimento à temperatura de $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, luminosidade de $50 \mu\text{m}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas.

Tabela 2. Composição dos meios de cultura e períodos de tempos (dias) usados no processo de embriogênese somática em gueroba (*Syagrus oleracea*) a partir de segmentos foliares *in vitro* sob efeito inicial de poliaminas

Componentes	Indução de calos	Diferenciação de embrião somático			Regeneração de plantas	
Meio de cultura	Y3	Y3	Y3	Y3	Y3	½MS
Vitaminas	MS	MS	MS	MS	MS	½MS
Glutamina (g.L ⁻¹)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-
Cisteína (g.L ⁻¹)	-	0,5	0,5	0,5	0,5	-
Caseína hidrolisada (g.L ⁻¹)	-	0,5	0,5	0,5	0,5	-
Picloram (µM)	450	40	20	-	-	-
Espermidina (µM)	100	100	100	100	-	-
Putrescina (µM)	500 e 1000	500 e 1000	500 e 1000	1000	-	-
BAP (µM)	-	-	-	0, 6 e 12	0, 6 e 12	-
ANA (µM)	-	-	-	-	0,54	-
Sacarose (g.L ⁻¹)	30	30	30	30	30	30
Phytigel (g.L ⁻¹)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Carvão vegetal (g.L ⁻¹)	2,5	-	-	-	-	1,5
Períodos (dias)	210	30	90	150	60	90

2.2.4 Análises estatísticas

Para análise do efeito das poliaminas combinadas em diferentes concentrações (seis tratamentos) na indução de calos e das diferentes concentrações de BAP (três tratamentos) na formação de embriões somáticos e regeneração de plantas de gueroba, a partir de segmentos foliares de plantas *in vitro*, adotou-se delineamento inteiramente casualizado. Cada tratamento foi composto por sete repetições, contendo oito explantes (segmentos transversais) cada.

O conjunto de dados obtido foi submetido à análise de variância (ANOVA) e, quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de significância, por meio do software estatístico R (R CORE TEAM, 2015).

2.3 Análises anatômica e histoquímica

Para a análise anatômica foram coletadas amostras de explantes que não foram submetidos aos tratamentos, de diferentes formações calogênicas e de embriões em diferentes estádios de desenvolvimento. As etapas de fixação, desidratação e emblocamento do material vegetal coletado 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 M (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 M, pH 7,2), por um período de 1 hora cada (sob vácuo); logo após, desidratação em série alcoólica crescente (30%, 50%, 70% - 100%, 100%), por uma hora cada (sob vácuo) e infiltração em historesina (Leica, Heidelberg, Alemanha), segundo as especificações do fabricante.

Posteriormente, cortes longitudinais e transversais (3-7 μm) foram obtidos em micrótomo rotativo manual (Leica®, RM212RT), distendidos e aderidos às lâminas microscópicas em placa aquecida à 40 °C. As secções obtidas foram coradas com Azul de Toluidina (0,5%) para caracterização estrutural e identificação de compostos fenólicos (O'BRIEN; FEDER; MCCYLLY, 1964).

As secções obtidas a partir do material emblocado também foram submetidas aos seguintes testes histoquímicos: *Periodic Acid Schiff* – PAS (O'BRIEN; MCCULLY, 1981) usado para identificar polissacarídeos neutros; Lugol (JOHANSEN, 1940) para detecção de grãos de amido; *Xylidine Ponceau* – XP utilizado para identificação de proteínas (VIDAL, 1970); Vermelho de Rutênio para visualização de pectinas (JOHANSEN, 1940) e Azul de Anilina para detecção de calose, sob excitação com luz ultravioleta (CURRIER, 1957; ESCHRICH; CURRIER, 1964), com auxílio de filtro UV de 340-380 nm. A obtenção e análise de imagens foram realizadas via microscópio Leica DM 750 e programa Leica Application Suite EZ.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Experimento 1: Influência dos pré-tratamentos e reguladores de crescimento na indução de calos, formação de embriões somáticos e regeneração de plantas de gueroba

3.1.1 Indução de calos

Após uma semana de cultivo em meio de indução, verificou-se leve intumescimento dos explantes, em todos os tratamentos, sobretudo, nas folhas internas (Figura 2B). Em geral, após o intumescimento, as folhas internas dos explantes se desprenderam do interior das bainhas externas e se expandiram, enquanto, nas bainhas externas iniciou-se um leve processo oxidativo.

Aos 30 dias, o intumescimento dos explantes ficou mais evidente, principalmente, nos explantes mais basais (cinco primeiros explantes) e sob efeito de 2,4-D. Maiores dimensões de explantes foliares nos primeiros dias de cultivo também foram relatadas por El Bar e El Dawayati (2014) em *Phoenix dactylifera*. A oxidação foi discreta ou quase nula e, quando observada, ocorreu nos tratamentos desprovidos de auxina e nas bainhas externas. Verificou-se ainda, nos tratamentos controles, desenvolvimento do meristema com emissão de parte aérea em 100 % das repetições (Figura 2C), semelhante ao mencionado por Steinmacher *et al.* (2007) em *B. gasipaes*. Calos primários translúcidos, com consistência mucilaginosa (macia e hidratada), foram verificados nas bainhas internas e externas em todos os tratamentos sob efeito de auxina (Figura 2D, 4A).

Aos 60 dias, observaram-se diferenças no padrão morfológico dos calos primários formados nos primeiros explantes, entre as auxinas testadas. Os tratamentos sob efeito da auxina Picloram apresentaram início de formação de estruturas nodulares compactas, brilhosas e com superfície lisa (Figura 2E, 4B), enquanto, os tratamentos sob efeito da auxina 2,4-D exibiram início de formação de calos nodulares mucilaginosos (Figura 2F). Notou-se também oxidação expressiva nos explantes privados de auxina, principalmente, naqueles mais diferenciados. Verificou-se, ademais, desenvolvimento do explante meristemático (primeiro explante), com emissão de parte aérea em 58,33% das repetições dos tratamentos sob efeito de 2,4-D.

Salienta-se que explantes com tamanhos reduzidos exibem alta capacidade morfogênica (BENKIRANE *et al.*, 2000; DELPORTE; MOSTADE; JACQUEMIN, 2001), consequência do rompimento dos domínios de comunicação intercelular existentes nos tecidos, o que facilita a entrada das células no ciclo de divisão celular e a desdiferenciação celular (BETTENCOURT *et al.*, 2016). Conforme Tran Thanh Van (2003), os fatores endógenos e os processos de transporte em explantes menores são bem menos complexos que aqueles verificados em explantes considerados mais volumosos, o que caracteriza uma vantagem do sistema de TCL. Bonga *et al.* (2016) reforçam essa ideia afirmando que explantes maiores exibem domínios do sistema simplástico mais intactos, que exercem efeitos inibitórios na morfogênese. Perturbações na parede celular causada por cortes seriados podem promover a perda de informação de posição e o não recebimento de sinais de diferenciação das células vizinhas, e, então, desencadear a desdiferenciação celular, como mencionado por Fehér (2015) em protoplastos.

A primeira avaliação quanto à percentagem de explantes oxidados (totalmente escurecidos) e de calos primários formados foi realizada aos 90 dias após a inoculação dos explantes em meio de indução e a interação entre os fatores testados não foi significativa (regimes de incubação x auxinas) para ambas variáveis (Figura 3). Quanto à oxidação, o tratamento desprovido de auxina exibiu maior percentagem (90,83%) (Figura 2G, 3). As auxinas foram igualmente eficientes em termos estatísticos para a formação de calos primários (taxa média de produção de 37,9% - Figura 3), e, de maneira geral, a região meristemática e as regiões mais basais (cinco primeiros explantes) exibiram notadamente maior produção de calos primários em comparação às demais regiões, semelhante ao relatado por Steinmacher *et al.* (2007) em *B. gasipaes* e Padilha *et al.* (2015) em *A. aculeata*. De acordo com Scherwinski-Pereira *et al.* (2010), esses resultados podem ser em função da maior quantidade de tecido pouco diferenciado ou meristemático presente nesses explantes.

Gueye *et al.* (2009a) também verificaram diferenças nas respostas entre os segmentos utilizados em *P. dactylifera*. Segundo esses autores, os segmentos com maior conteúdo de auxina endógena (AIA) e, conseqüentemente, maior capacidade de homeostase de auxina, foram mais competentes à formação de calos quando expostos à auxina externa. Esses autores ainda afirmam que a capacidade de formação de calos varia em função do grau de diferenciação do explante foliar, com destaque para aqueles

nem totalmente diferenciados (presença de parênquima fascicular lignificado e esclerênquima diferenciado) nem insuficientemente diferenciados.

Esperavam-se diferenças na porcentagem de formação de calos entre os regimes de incubação (luz e escuro) previamente adotados, dados os efeitos da disponibilidade de luz nos níveis de hormônios endógenos, como o relatado por Grzyb *et al.* (2017) em *Cyathea delgadii*. Esses autores verificaram que somente explantes previamente mantidos no escuro foram capazes de produzir embriões somáticos, devido ao baixo nível de ABA e ao alto conteúdo de AIA e citocininas endógenas conquistados sob essa condição. No presente trabalho, os pré-tratamentos dos explantes (exposição à luz ou escuro) não promoveram diferenças significativas nas respostas obtidas.

A correlação entre regeneração *in vitro* e incubação dos explantes em diferentes condições de disponibilidade de luz tem sido investigada em diferentes rotas morfogênicas (PÁDUA *et al.*, 1998; REUVENI; EVENOR, 2007; MILOJEVIĆ *et al.*, 2012), com resultados diversos (positivos e negativos) da presença e ausência de luz. Além das modificações nos níveis de hormônios endógenos supracitadas, a disponibilidade de luz também pode alterar a anatomia dos explantes. De acordo com Compton (1999), explantes cultivados sob condição de escuro (estiolados) exibem características anatômicas típicas, como paredes celulares mais finas, que podem favorecer o transporte de reguladores de crescimento exógenos para sítios específicos de regeneração.

Após 240 dias em meio de indução, foi avaliada a porcentagem de formação de calos embriogênicos (capazes de formar embriões somáticos) (Figura 3). Em termos morfológicos, esses calos apresentavam formato nodular, consistência compacta, coloração variando entre bege e amarela e superfície lisa e brilhosa (Figura 2H, 6K) e anatomicamente, exibiam uma zona bem definida contendo células com características meristemáticas (ver seção 3.1.4 – Figura 6L, M). Calos embriogênicos foram visualizados somente nos tratamentos sob efeito de Picloram (46,8%), independente dos pré-tratamentos adotados (sistema de incubação – escuro e luz) (Figura 3). A taxa de calo embriogênico atingida nesse experimento foi próxima, porém, superior à relatada por Steinmacher *et al.* (2007), os quais obtiveram uma taxa de 43,0% de calo embriogênico em explantes cultivados em 300 µM de Picloram, e por Scherwinski-Pereira *et al.* (2010), que alcançaram uma taxa de 41,5% de calo embriogênico em explantes cultivados em 450 µM de Picloram.

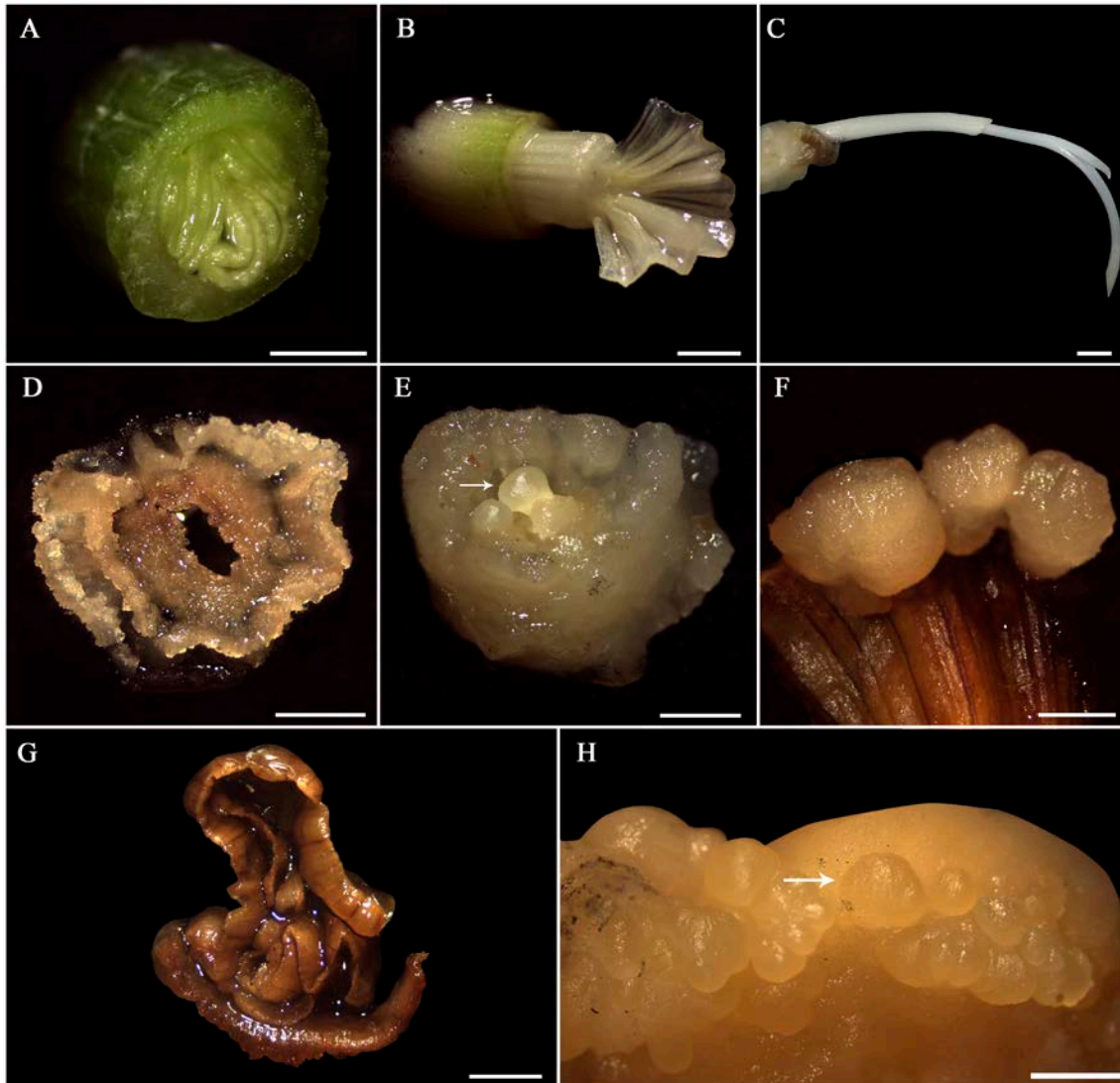


Figura 2. Aspectos da embriogênese somática induzida a partir de segmentos foliares de plantas jovens germinadas *in vitro* de guerobera (*Syagrus oleracea*). A: Segmento foliar utilizado como explante. B: Segmento foliar intumescido após sete dias em meio de indução. C: Desenvolvimento do meristema com emissão de parte aérea após 30 dias em meio desprovido de regulador de crescimento. D: Calo primário formado após 30 dias de cultivo em meio de indução. E: Calo primário exibindo estrutura nodular com superfície lisa e brilhosa (seta) após 60 dias em meio sob efeito de Picloram. F: Calos nodulares mucilaginosos observados após 60 dias em meio sob efeito de 2,4-D. G: Explante totalmente oxidado após 90 dias em meio desprovido de regulador de crescimento. H: Calos nodulares com características embriogênicas (seta) observadas em meio sob efeito de Picloram. Barras = A, B: 1 mm; C: 4 mm e D-H: 2 mm.

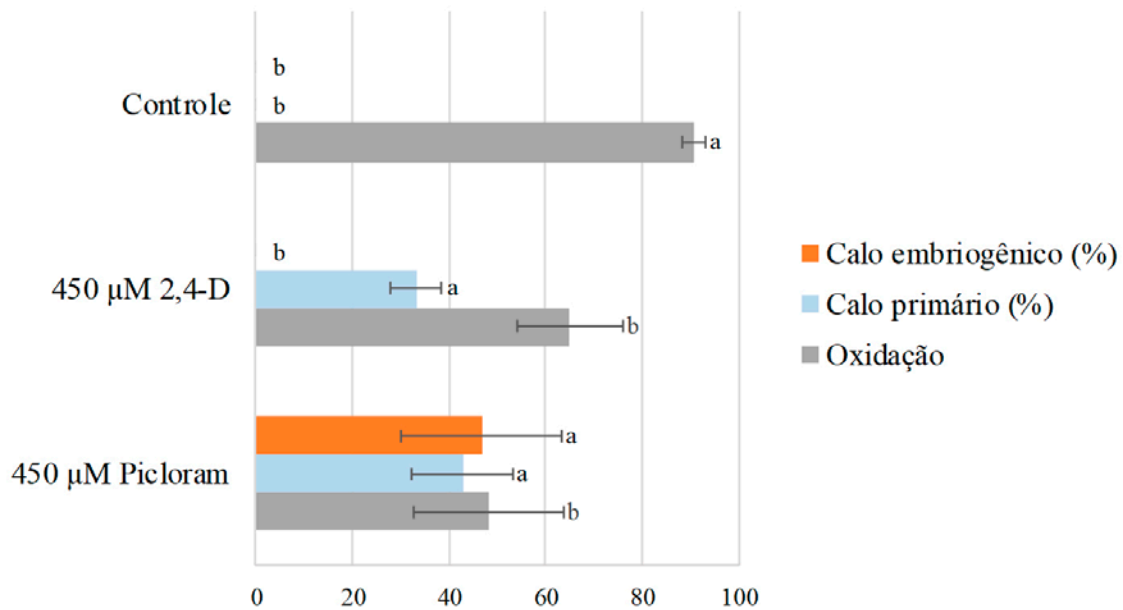


Figura 3. Efeito das auxinas Picloram e 2,4-D (450 µM) na percentagem de oxidação, de formação de calos primários e de calos embriogênicos durante a embriogênese somática em gueroba (*Syagrus oleracea*), a partir de segmentos foliares de plantas germinadas *in vitro*. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam o erro padrão.

Segundo Bonga *et al.* (2016), baseado em conceitos previamente mencionados por Steward (1961), a expressão da pluripotência ou totipotência de células e tecidos é geralmente inibida em função de restrições impostas por tecidos vizinhos, daí a importância do isolamento das células ou tecidos via TCL. Além do mais, a exposição de explantes feridos às condições de cultivo *in vitro* diversas (exemplo, suprimento sub-ótimo de reguladores de crescimento) promovem alto nível de estresse celular. Essa exposição, de acordo com Fehér, Pasternak e Dudits (2003), pode ser um fator favorável ao aumento da capacidade morfogênica, dado o maior contato com componentes estressantes do meio (AHN *et al.*, 1996). Além do mais, o próprio estresse ocasionado pelo seccionamento do explante, às vezes, pode ser o suficiente para iniciar a embriogênese somática (SMITH; KRIKORIAN, 1989). Grzyb *et al.* (2017), por exemplo, relataram que a redução drástica no conteúdo hormonal causada pela excisão do explante é suficiente para desencadear a competência embriogênica em *C. delgadii*.

3.1.2 Diferenciação de embriões somáticos

Os calos formados no meio de indução foram transferidos para meios contendo concentrações reduzidas de auxina, visando à conversão em embriões somáticos. Após 90 dias em meio de diferenciação (40 μ M de Picloram), verificou-se o desenvolvimento da massa embriogênica (Figura 4F), além de vários embriões em fase globular, caracterizados por estruturas globulares, translúcidas, com superfície lisa e brilhosa, alguns, inclusive, fusionados.

Aos 150 dias, os embriões somáticos tornaram-se mais evidentes, com coloração variando entre branco e amarelo (Figura 4G, H) e verificou-se, em alguns explantes, o surgimento de uma estrutura esponjosa semelhante a um haustório intumescido de embrião zigótico (Figura 4I). Alguns explantes, sob efeito da auxina 2,4-D, exibiram transição da consistência mucilagínosa para friável (Figura 8), considerados anatomicamente embriogênicos (ver seção 3.1.4).

Aos 240 dias em meio de diferenciação, determinou-se o número de embriões somáticos, a grande maioria em estágio globular e alguns poucos exibindo início de alongamento (Figura 4J, L). Embriões somáticos somente foram visualizados no tratamento sob efeito de Picloram, que exibiu um valor médio de 8,4 embriões (total de 67 embriões somáticos). Segundo Karun *et al.* (2004), o destaque do Picloram durante a embriogênese somática se deve à efetividade na sua absorção e mobilização, bem como a sua rápida metabolização em sítios específicos. Salienta-se que a literatura é escassa em termos da compreensão detalhada dos eventos fisiológicos envolvidos na atuação do Picloram na indução e desenvolvimento de rotas morfogênicas. De maneira geral, o desenvolvimento dos embriões somáticos ocorreu de maneira totalmente assicrônica, característica comum em outros sistemas embriogênicos (CORREIA; CANHOTO, 2010; SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2010; PÁDUA *et al.*, 2017) e com fusão marcante, certamente, devido a origem multicelular.

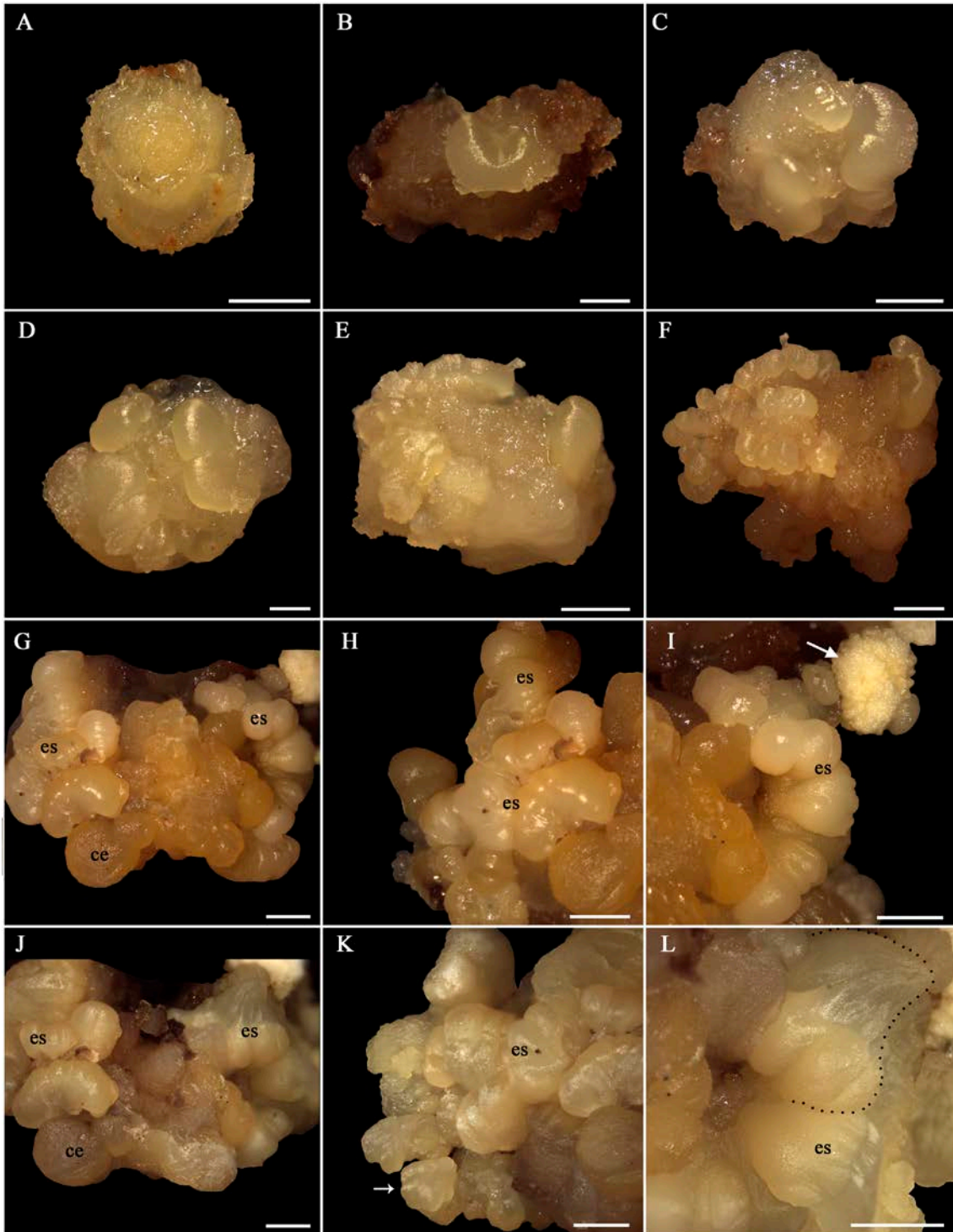


Figura 4. Evolução morfológica do calo primário a embriões somáticos de gueroba (*Syagrus oleracea*), a partir de segmento foliar de planta jovem germinada *in vitro*, em meio com Picloram. A: Calos primários translúcidos, com consistência mucilaginosa, verificados sobre explante basal (primeiro explante), após 30 dias em meio de indução. B-E: Desenvolvimento de estruturas nodulares compactas, brilhosas e com superfície lisa (calos embriogênicos) após 60, 150, 180 e 240 dias, respectivamente, em meio de indução. F: Desenvolvimento da massa embriogênica após 90 dias em meio de diferenciação. G, H: Calos com características embriogênicas e embriões somáticos em fase semelhante a globular após 150 dias em meio de diferenciação. I: Embriões

somáticos e estrutura esponjosa semelhante a um haustório (seta) intumescido de embrião zigótico observados após 150 dias em meio de diferenciação. J: Calos embriogênicos e embriões somáticos após 240 dias em meio de diferenciação. K: Individualização de embriões somáticos (seta) após 240 dias em meio de diferenciação. L: Alongamento de embriões somáticos (linha pontilhada) após 240 dias em meio de diferenciação. Abreviações: (ce) calo embriogênico e (es) embrião somático. Barras = B: 1 mm e A, C-L= 2 mm.

3.1.3 Regeneração de plantas

No primeiro mês em meio totalmente desprovido de reguladores de crescimento, acrescido de carvão ativado e sob disponibilidade de luz, notou-se, em alguns agrupamentos (*clusters* embriogênicos), além da aquisição de coloração branca por parte de alguns embriões somáticos, a expansão da massa esponjosa branca observada já na fase de diferenciação, a qual adquiriu coloração esverdeada (Figura 5A).

No terceiro mês, verificaram-se diferentes respostas dos explantes, incluindo, degeneração de *clusters* considerados embriogênicos (perda do formato nodular e mudança para uma consistência esponjosa branca), multiplicação da massa calogênica friável (limitada alguns explantes provenientes do meio sob efeito de 2,4-D) e formação de raízes com diferentes espessuras (Figura 5B), essa última resposta a mais frequente. O processo de germinação foi raro e com evidentes anormalidades (Figura 5C). Embriões somáticos incompletos e baixa frequência de plantas regeneradas também foram verificados por Padilha *et al.* (2015), aplicando-se o sistema de TCL, em *A. aculeata*. Esses autores atribuíram a baixa taxa de conversão dos embriões somáticos à origem multicelular, origem também proposta nesse trabalho (ver seção 3.1.4).

A ausência de padrão durante o desenvolvimento de embriões somáticos, bem como a ocorrência de anormalidades, tem sido comumente relatada em várias outras espécies vegetais (BOTTI; VASIL, 1984; NICKLE; YEUNG, 1993; SCHUMANN *et al.*, 1995; BENELLI *et al.*, 2001; GOH *et al.*, 2001; SAÉNZ *et al.*, 2006). Tais anormalidades podem estar associadas com a concentração e o tipo de regulador de crescimento adicionado ao meio, bem como o longo tempo de cultivo *in vitro* (KONIECZNY *et al.*, 2012).

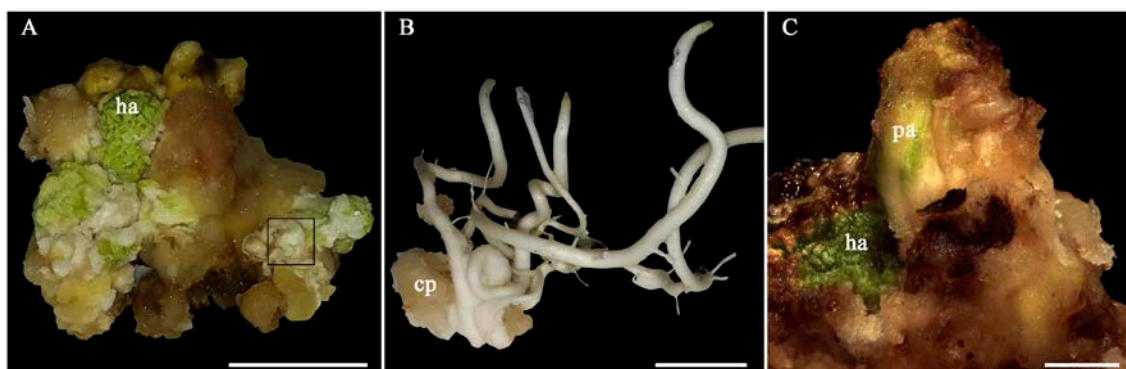


Figura 5. Diferentes respostas de explantes em meio de regeneração. A: Massa haustorial verde e embriões somáticos brancos (quadrado). B: Rizogênese. C: Germinação anormal (emissão de parte aérea fusionada com massa calogênica). Abreviações: cp (calo primário), (ha) haustório e (pa) parte aérea. Barras = A, B: 3 cm e C: 2 mm.

Tabela 3. Panorama dos dados obtidos (valores médios considerando quatro repetições/tratamento) durante a embriogênese somática em gueroba (*Syagrus oleracea*) a partir de segmentos foliares oriundos de plantas germinadas *in vitro*

Tratamentos	Com clorofila	Sem clorofila	Média	Desvio padrão	Coefficiente de variação	Erro padrão	Tempo (dias)
Controle	Ox (%)	88,3	93,3	90,8	7,1	7,8	90
	Cp (%)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	90
	Ce (%)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	240
	Ce com ES (%)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	480
	N° de ES	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	480
Pic	Ox (%)	73,3	23,3	48,3	44,3	91,7	90
	Cp (%)	36,8	48,8	42,8	30,1	70,4	90
	Ce (%)	31,3	62,5	46,9	47,1	100,5	240
	Ce com ES (%)	25,0	62,5	43,8	49,6	113,3	480
	N° de ES	5,0	11,8	8,4	11,1	133,0	480
2,4-D	Ox (%)	71,7	58,3	65,0	31,2	48,0	90
	Cp (%)	25,0	41,3	33,2	14,5	43,7	90
	Ce (%)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	240
	Ce com ES (%)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	480
	N° de ES	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	480

Abreviações: (Ox) oxidação, (Cp) calo primário, (Ce) calo embriogênico, (N°) número, (ES) embrião somático.

3.1.4 Análises anatômica e histoquímica

A Figura 6 caracteriza morfoanatomicamente os segmentos (comprimento variando entre um e dois milímetros) de folhas imaturas de gueroba (*Syagrus oleracea*), provenientes de plantas germinadas *in vitro*, utilizadas como explantes iniciais na indução da embriogênese somática. Em termos morfológicos, a folha imatura de gueroba apresenta superfície lisa, textura maleável, nervuras paralelas entre si, característica típica das Monocotiledônea – Liliopsida (Figura 6A).

O corte transversal das folhas imaturas revela a presença de nervuras vasculares de maior calibre, de calibre intermediário e de menor calibre, distintas anatomicamente (gradiente de diferenciação) e em tamanho (Figura 6B). As veias de maior calibre exibem pólos vasculares distinguíveis (Figura 6C, xilema e floema) envoltos por células esclerenquimáticas (fibras) e parenquimáticas (Figura 6C). As veias de calibre intermediário e de menor calibre apresentam xilema pouco diferenciado ou ausente. Os explantes foliares, em ambas as faces, possuem epiderme unisseriada, com células de tamanho homogêneo e justapostas (Figura 6C) e estômatos nivelados com as demais células da epiderme. O mesofilo é constituído por parênquima homogêneo (Figura 6B-D), composto por células arredondadas arranjadas de forma compacta e intercalado por feixes vasculares. Idioblastos foram observados distribuídos no mesofilo (Figura 6D). As análises histoquímicas não revelaram presença de compostos de reserva (grãos de amido e proteínas) em folhas imaturas de plantas germinadas *in vitro*. Como explanado na descrição supracitada, os explantes oriundos dos cortes transversais consistem num conjunto de células de diferentes tecidos, preconizado por Tran Thanh Van (2003) como *transverse Thin Cell Layer* (tTCL), ou mais atualmente proposto por Silva (2008) como *transverse Thin Tissue Layer* (tTTL).

Aos 40 dias em meio de cultivo sob efeito de regulador de crescimento, notaram-se divisões celulares em células parenquimáticas vasculares, que geraram uma nova população celular com características tipicamente meristemáticas (menor diâmetro, formato isodiamétrico, algumas células com núcleos volumosos evidentes e citoplasma denso) (Figura 6E-J). Além disso, também foram observados agrupamentos de duas ou mais células, com espaços intercelulares nítidos (Figura 6F), semelhante ao relatado por Gueye *et al.* (2009a, b) em *P. dactylifera* e Padilha *et al.* (2015) em *A. aculeata*. Grãos de amido e proteínas não foram observados. A alta responsividade de células relacionadas aos tecidos vasculares também foi relatada por Schwendiman,

Pannetier e Michaux-Ferriere (1988) em *E. guineensis*, Guerra e Handro (1998) em *Euterpe edulis*, Steinmacher *et al.* (2007) em *B. gasipaes* e Jayaraj *et al.* (2015) em *C. nucifera*.

Na Figura 6K, observa-se calo embriogênico, nodular, compacto, com superfície lisa e brilhosa, já verificado aos 60 dias em meio de indução a partir de alguns poucos calos primários originados em meio com Picloram. Tal calo foi caracterizado pela presença de uma zona nitidamente meristemática na região periférica, formada por células em intensa divisão celular (Figura 6L, M), em sentido, sobretudo, periclinal (Figura 6M). Essa zona exibiu quantidades significativas de grãos de amido, conforme teste com reagente Lugol (Figura 6L). A zona em referência se assemelha àquela descrita como *like-cambium* por Schwendiman, Pannetier e Michaux-Ferriere (1988) em calos oriundos de tecidos foliares de *E. guineensis* e por Verdeil *et al.* (1994) em calos provenientes de inflorescência imaturas de *C. nucifera*. Os autores Saézn *et al.* (2006) e Sandoval-Cancino *et al.* (2016) também verificaram uma zona periférica meristemática em calos obtidos a partir de plúmulas e inflorescências imaturas de *C. nucifera*, respectivamente.

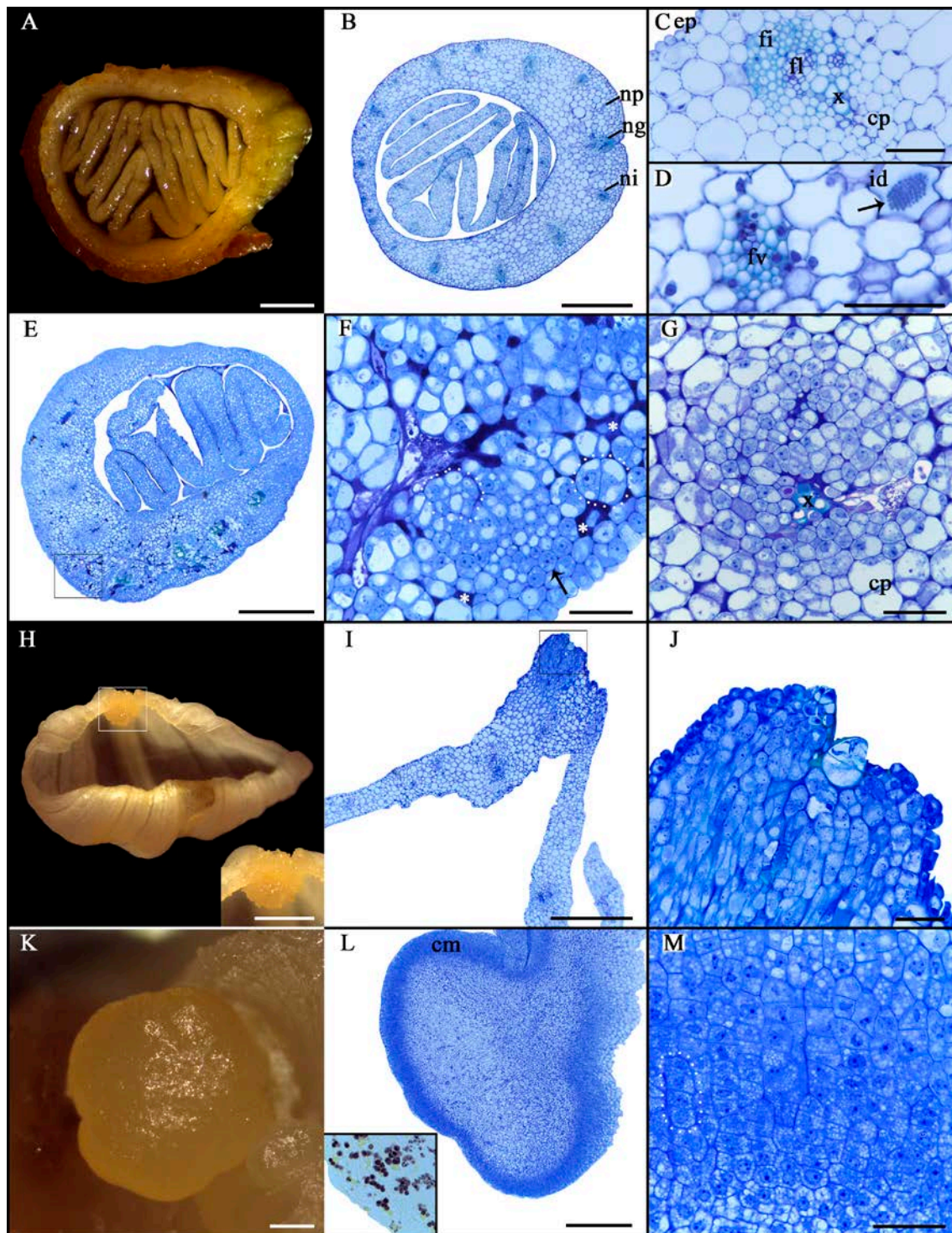


Figura 6. Caracterização morfoanatômica e histoquímica de folhas imaturas de plantas jovens germinadas *in vitro* de gueroba (*Syagrus oleracea*) e da formação de calos a partir desses explantes. A: Aspecto externo de segmento de folha imatura de gueroba. B: Secção transversal de segmento de folha imatura de gueroba não submetida ao tratamento com regulador de crescimento; notar feixes vasculares e células do mesófilo diferenciadas. C: Feixe vascular de maior calibre. D: Feixe vascular de calibre intermediário e detalhe de idioblasto (seta). E: Secção transversal de segmento de folha imatura de gueroba aos 40 dias em meio de indução, com desorganização do parênquima (perivascular e vascular) e proliferação celular nas adjacências dos feixes

vasculares. F: Detalhe da secção mencionada na letra E, evidenciando uma nova população de células com características meristemáticas (seta) e *clusters* de células (pontilhados) com nítidos espaços intercelulares (*). G: Proliferação celular nas adjacências de elementos traqueais. H: Calo primário na quina do explante, aos 40 dias em meio de indução. I, J: Proliferação celular nas adjacências do feixe vascular. K: Calo embriogênico. L: Secção anatômica de calo embriogênico com zona meristemática periférica rica em grãos de amido (quadrado). M: Detalhe da secção mencionada na letra L, que evidencia intensa divisão celular, principalmente, no sentido periclinal (pontilhado). Abreviações: (cp) células parenquimáticas, (cm) células meristemáticas, (ep) epiderme, (fi) fibra – células esclerenquimáticas, (fl) floema, (fv) feixe vascular, (id) idioblasto, (ng) nervura de grande calibre, (ni) nervura de calibre intermediário, (np) nervura de pequeno calibre e (x) xilema. Barras = A, K: 1 mm; H: 2 mm; B, E, I, L: 500 µm e C, D, F, G, J, M: 50 µm.

Aos 90 dias em meio de diferenciação foram observados embriões somáticos globulares caracterizados morfológicamente como estruturas translúcidas, com superfície lisa e brilhosa (Figura 7A); anatomicamente caracterizados pela presença de protoderme definida e células com paredes delgadas, vacuolação variável e ausência de espaços intercelulares (Figura 7B-E) e histoquimicamente pela presença de corpos proteicos identificados com corante XP (Figura 7F-H) e ausência de grãos de amido, mediante teste com reagente Lugol e PAS. As estruturas nodulares consideradas embriões somáticos globulares se asselem morfoanatomicamente àqueles mencionadas por Michaux-Ferrière, Grout e Carron (1992) em *Hevea brasiliensis*.

É consenso entre vários autores que a presença de protoderme é um indicador da formação do embrião somático (YEUNG, 1995; QUIROZ-FIGUEROA *et al.*, 2002; SHARMA; MILLAM, 2004; JALIL *et al.*, 2008). Esse tecido é considerado o primeiro que pode ser indentificado histologicamente no processo de embriogênese (WEST; HARADA, 1993), bem como um pré-requisito para o desenvolvimento dos estádios embriogênicos posteriores (JONG *et al.*, 1992).

Além da presença de protoderme definida, a ausência de conexão vascular com o explante original (Figura 7B, C) e aparentes promeristemas (caulinar e radicular) em formação (Figura 7C, E) ratificam a ocorrência de embriões somáticos verdadeiros (DELPORTE *et al.*, 2014). As evidências obtidas nesse estudo (ausência de proembriões e de estruturas semelhantes a suspensores, difícil desprendimento dos embriões somáticos dos calos de origem e ocorrência de fusão) suportam a origem multicelular de embriões somáticos de guroba a partir de tecidos foliares de plantas germinadas *in vitro*, embora estudos posteriores sejam necessários para confirmação definitiva.

Presença de proteínas em embriões somáticos em estádios iniciais de desenvolvimento também foi mencionada em *Gossypium hirsutum* (SHOEMAKER; CHRISTOFFERSON; GALBRAITH, 1987), *Brassica napus* (CROUCH *et al.*, 1982), *E. guineensis* (MORCILLO *et al.*, 1998) e *Juglans regia* (JARITEH *et al.*, 2015), embora quantitativamente aquém do encontrado em embriões zigóticos. Por outro lado, corpos proteicos não foram observados em embriões somáticos globulares em *Saccharum officinarum* (BRISIBE *et al.*, 1993) e *Eucalyptus globulus* (PINTO *et al.*, 2010). O armazenamento desses compostos provavelmente está relacionado à posterior conversão dos embriões somáticos em plântulas (CANGAHUALA-INOCENTE *et al.*, 2004).

Grãos de amido ausentes em embriões somáticos em estágio globular também foram verificados por Botti e Vasil (1984) em *Pennisetum americanum* e por Rodriguez e Wetzstein (1998) em *Carya illinoensis*. Acredita-se que o amido é consumido rapidamente durante a formação das áreas embriogênicas e é ausente em embriões somáticos em estádios mais avançados de desenvolvimento (RODRIGUEZ; WETZSTEIN, 1998; QUIROZ-FIGUEROA *et al.*, 2002).

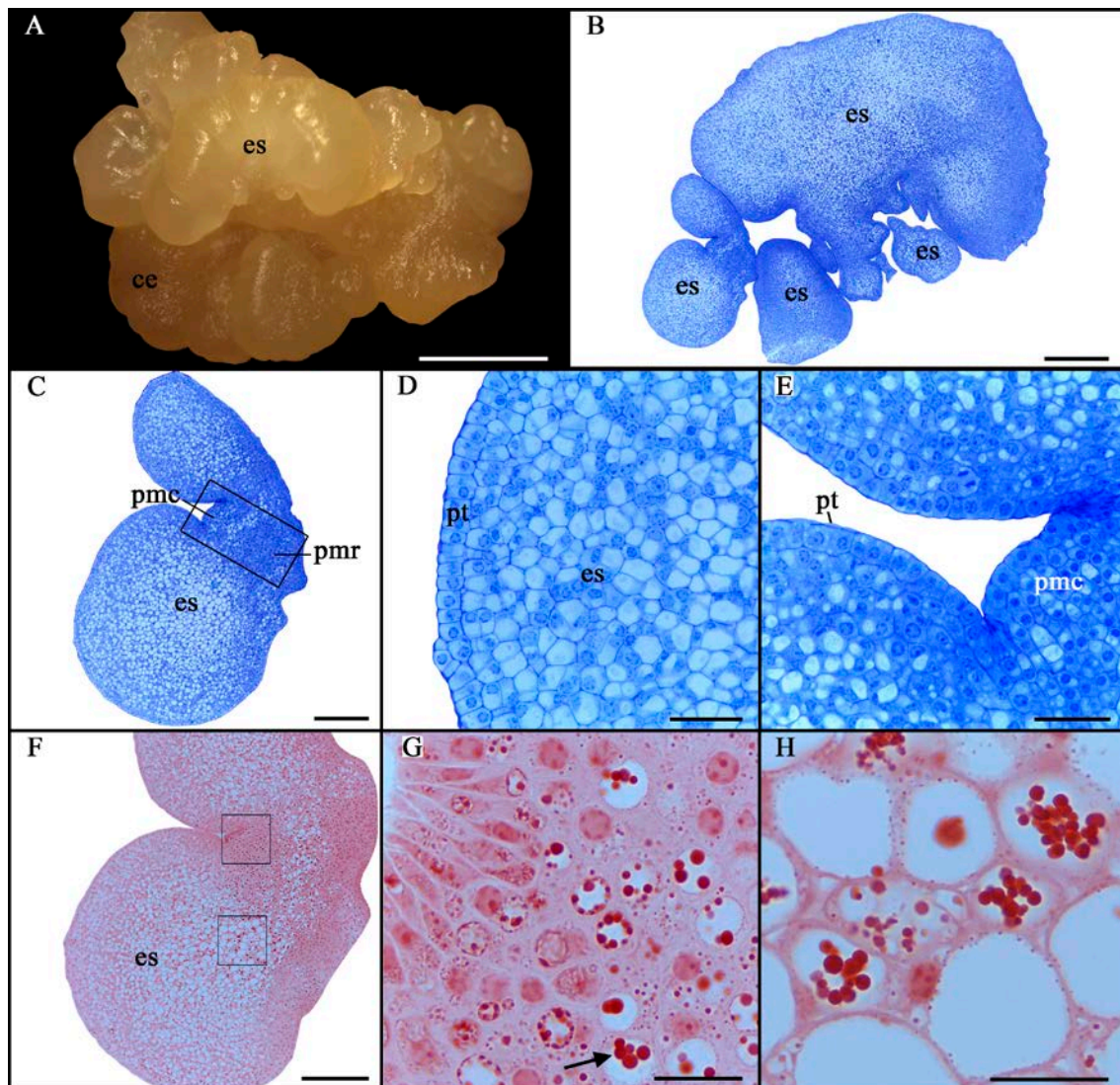


Figura 7. Caracterização morfoanatômica e histoquímica de embriões somáticos de guerobera (*Syagrus oleracea*), provenientes de folhas imaturas de planta jovem germinada *in vitro*. A: *Cluster* de embriões somáticos globulares. B: Secção anatômica de *cluster* de embriões somáticos globulares. C: Detalhe anatômico da secção mencionada na letra B, evidenciando prováveis promeristemas em formação (quadrado). D: Detalhe da protoderme. E: Detalhe de provável promeristema caulinar. F, G, H: Corpos proteicos identificados com corante XP (quadrado, seta). Abreviações: (ce) calo embriogênico, (es) embrião somático, (pmc) promeristema caulinar, (pmr) promeristema radicular e (pt) protoderme. Barras = A: 2 mm; B: 500 μ m; D, E: 50 μ m; C, F: 200 μ m e G, H: 20 μ m.

Em meio de diferenciação de embriões somáticos, além da formação de embriões somáticos, observou-se que alguns calos sob efeito da auxina 2,4-D, exibiram transição da consistência mucilaginosa para friável (Figura 8), caracterizada pela fácil fragmentação (FRANSZ; SCHEL, 1991b) provavelmente em função da ação de enzimas líticas de componentes da parede celular produzidos por dictiosomos e retículos endoplasmáticos (PROFUMO; GASTALDO; RASCIO, 1987). Esses calos

anatomicamente consistiam em um aglomerado de células embriogênicas caracterizadas por citoplasma denso, núcleos grandes, nucléolos proeminentes, vacúolos fragmentados (pequenos) (Figura 8B-D, F) e, ainda, acúmulo conspícuo de amiloplastos (grãos de amido) (Figura 8G), sobretudo, ao redor dos núcleos, o que segundo Stein *et al.* (2010), sugere intensa síntese de RNA e atividade metabólica.

Algumas dessas células se dividiram, formando grupos de células (Figura 8D, F) isoladas por uma parede celular mais grossa com deposição de calose (β - 1,3 - glucanas), evidenciada pela intensa fluorescência observada por coração com Azul de Anilina e exposição à luz ultravioleta (Figura 8E). O tecido parenquimático adjacente exibe aparente degeneração (Figura 8B, D, G). Esses *clusters* de células isoladas são denominadas por diferentes autores de proembriões (GOH *et al.*, 2001; VERDEIL *et al.*, 2001) e os observados aqui, diferentemente do relatado por outros autores (VERDEIL *et al.*, 2001; GOH *et al.*, 2001; MOURA *et al.*, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2012), apresentavam quantidades significativas de grãos de amido, sobretudo, ao redor dos núcleos (Figura 8G). A intensa proliferação dessas células e a ausência de desenvolvimento de embriões somáticos podem estar relacionadas, provavelmente, com o longo período de exposição à auxina como mencionado por Thomas, Konar e Street (1972), ou ainda, conforme Montoro *et al.* (1993), podem ser consequentes da inadequacidade do sistema de cultura.

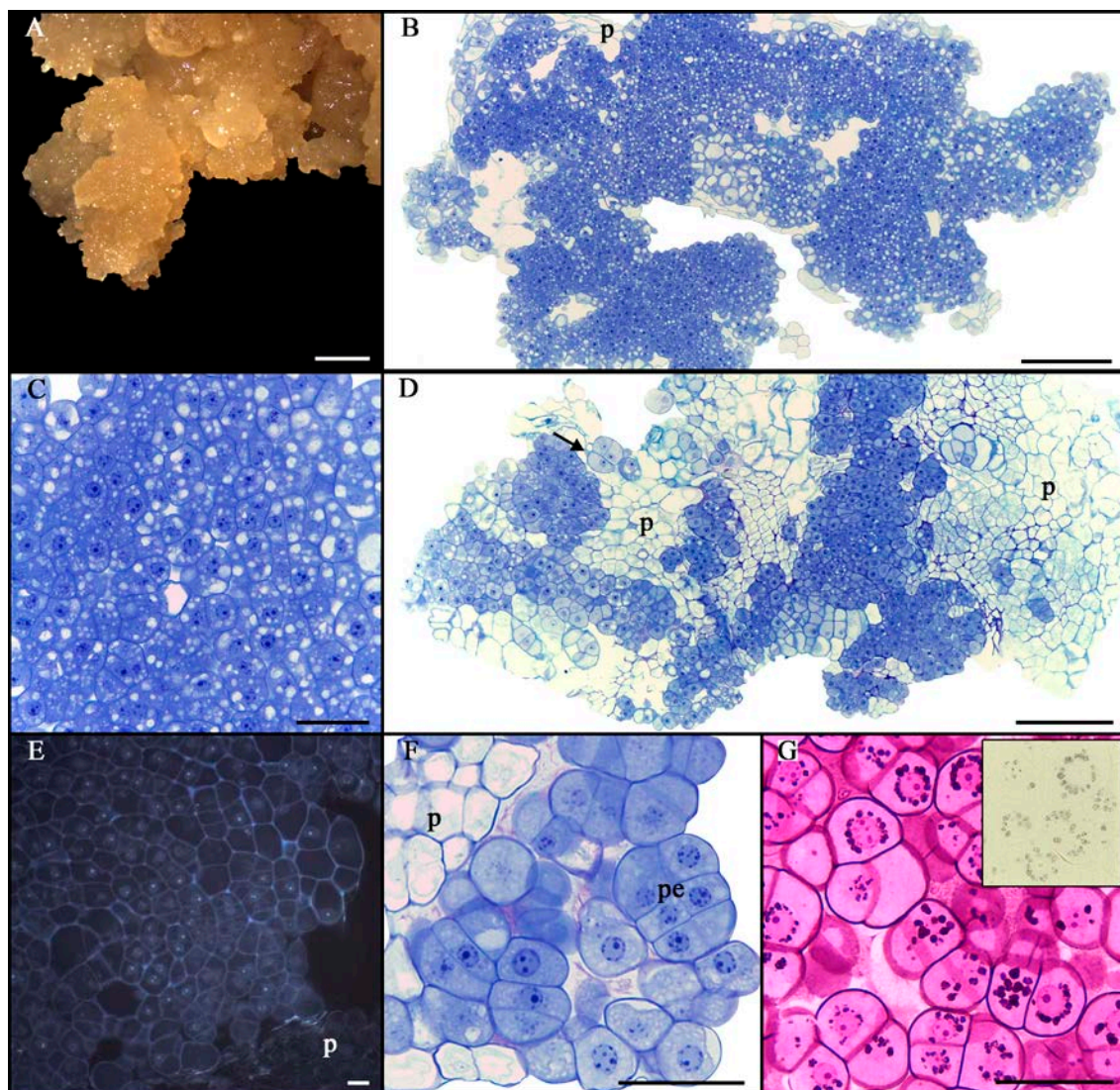


Figura 8. Aspectos morfoanatômicos e histoquímicos de calo friável obtido a partir de segmentos foliares de plantas jovens germinadas *in vitro* de gueroba (*Syagrus oleracea*). A: Calo friável. B: Secção anatômica de calo friável. C: Detalhe da secção mencionada na letra B, que evidencia células com citoplasmas densos, núcleos grandes e vacúolos fragmentados. D: Secção anatômica de calo friável evidenciando células embriogênicas (citoplasma denso), proembriões (seta) e células parenquimáticas. E: Calose identificada por meio de coração com Azul de Anilina e exposição à luz ultravioleta; notar ausência de calose nas células parenquimáticas laterais. F: Células embriogênicas isoladas e proembriões. G: Amiloplastos conspícuos observados por teste com reagentes PAS e Lugol (quadrado lateral). Abreviações: (p) parênquima e (pe) proembriões. Barras = A: 2 mm; B, D: 200 μ m; C, F, G: 50 μ m e E: 10 μ m.

A deposição de calose visualizada nesse trabalho é uma manifestação fisiológica comum à exposição a diferentes estresses (ZAVALIEV *et al.*, 2011; MOON *et al.*, 2015), o que não seria surpresa a sua ocorrência em sistemas embriogênicos, devido à relação íntima entre estresses e a via de embriogênese somática. Portanto, são recorrentes na literatura os relatos de acúmulo de calose nas paredes celulares de células

consideradas embriogênicas (DUBOIS *et al.*, 1990; VERDUS *et al.*, 1993; VERDEIL *et al.*, 2001; YOU; YI; CHOI, 2006; GRIMAULT *et al.*, 2007; MIHALJEVIC *et al.*, 2011; TAO *et al.*, 2012; MAZRI *et al.*, 2013). Autores sugerem que a calose promove a regulação da comunicação intercelular, mais especificamente interrupção da comunicação célula-a-célula (fechamento de plasmodesmos – via simplástica), o que pode estimular a reprogramação de células embriogenicamente competentes e induzir o desenvolvimento do embrião somático (MOON *et al.*, 2015) de origem unicelular (YOU; YI; CHOI, 2006).

Calos morfoanatomicamente similares ao calo friável relatado aqui também têm sido verificados durante a via de embriogênese somática em diferentes espécies de palmeiras, como *Calamus merrillii* e *C. subinermis* (GOH *et al.*, 2001), *C. nucifera* (VERDEIL *et al.*, 2001) e *E. guineensis* (AHÉE *et al.*, 1981; SANÉ *et al.*, 2006) e de outras famílias botânicas, como *Ranunculus sceleratus* (THOMAS; KONAR; STREET, 1972) e *Zea mays* (SAMAJ *et al.*, 1999). Tais calos apresentam potencial interesse para o estabelecimento de culturas embriogênicas em suspensão celular.

3.2 Experimento 2: Influência de poliaminas na indução de calos, formação de embriões somáticos e regeneração de plantas de gueroba

3.2.1 Indução de calos

Após estabelecimento da auxina Picloram como mais responsiva, avaliou-se a influência das poliaminas Putrescina e Espermidina na indução de calos a partir de pequenos explantes foliares obtidos de plantas germinadas *in vitro* de gueroba.

Aos 30 dias em meio de indução, verificou-se, de modo geral, nos explantes mais basais formações calogênicas mucilaginosas (hidratadas, aquosas) e translúcidas (Figura 11A) e nos quatro últimos explantes observou-se oxidação expressiva. Aos 60 dias, observaram-se, na maioria dos tratamentos adotados e, sobretudo, nos dois primeiros explantes, estruturas nodulares compactas, brilhosas e com superfície lisa.

Aos 90 dias, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos testados para as variáveis oxidação e calo primário, com percentagens médias de 18,2% e 33,9%, respectivamente (Tabela 4).

Com 120 dias em meio de indução, notou-se a formação de calos embriogênicos em todos os tratamentos com poliaminas. Tais calos, de maneira geral, foram

visualizados nos dois primeiros explantes (sobre calos mucilaginosos translúcidos) e exibiam formato nodular, consistência compacta, coloração variando entre bege e amarelo e superfície lisa e brilhosa (Figura 11B). Aos 150 dias, além das formações calogênicas supracitadas, verificaram-se também calos sem formato definido, ora translúcido ora bege e com consistência friável (Figura 11C) e o surgimento de eventuais *clusters* de embriões somáticos em estágio globular (Figura 11D).

A percentagem de formação de calos embriogênicos foi avaliada após 210 dias em meio com alta concentração de Picloram, sem diferenças estatísticas constatadas entre os tratamentos testados (com e sem poliaminas) (Tabela 4), o que indica que o acréscimo de poliaminas não foi decisivo para a formação de calos embriogênicos a partir de segmentos foliares jovens de gueroaba. Desde o primeiro relato do papel crítico das poliaminas no processo de embriogênese somática, presumivelmente, na diferenciação celular (MONTAGUE *et al.*, 1978), vários outros trabalhos foram desenvolvidos com objetivo de analisar as alterações nos níveis celulares de poliaminas durante a embriogênese somática de plantas (SANTANEN; SIMOLA, 1992; MINOCHA *et al.*, 1993; YADAV; RAJAM, 1997; BERTOLDI *et al.*, 2004; KACKAR; SHEKHAWAT, 2007; PAUL; MITTER; RAYCHAUDHURI, 2009; MAURI; MANZANERA, 2011; REIS *et al.*, 2016).

Muitos autores relatam efeitos positivos da aplicação exógena de poliaminas nas várias fases da embriogênese somática em diferentes espécies (YADAV; RAJAM, 1997; ADKINS *et al.*, 1998; KEVERS *et al.*, 2000; TAKEDA *et al.*, 2002; PAUL; MITTER; RAYCHAUDHURI, 2009; AHMADI *et al.*, 2014; CHENG *et al.*, 2015; REIS *et al.*, 2016; TAN *et al.*, 2017). Por outro lado, há relatos de que a aplicação exógena de poliaminas não promove efeitos na embriogênese somática (VONDRÁKOVÁ *et al.*, 2015) ou causa efeitos inibitórios em alguma fase específica do processo (LITZ; SHAFFER, 1987; FOBERT; WEBB, 1988). Em palmeiras, o uso de poliaminas na embriogênese somática ainda é limitado, com alguns relatos de efeitos positivos em *C. nucifera* (ADKINS *et al.*, 1998; RAJESH *et al.*, 2014), *E. guineensis* (RAJESH *et al.*, 2003; CORRÊA *et al.*, 2016) e *P. dactylifera* (HEGAZY; ABOSHAMA, 2010).

Salienta-se que poliaminas podem assumir diferentes formas, dada a natureza policatiônica, que permite a interação com macromoléculas aniônicas (DNA e RNA) e grupos negativos de membrana (MALÁ *et al.*, 2009). Em função disso, podem exercer diferentes efeitos na embriogênese somática (CHENG *et al.*, 2015), positivos e

inibitórios (TAKEDA *et al.*, 2002), a depender da espécie, condições de cultivo (REIS *et al.*, 2016), poliamina em questão, concentração (YADAV; RAJAM, 1997) e tempo de exposição (AHMADI *et al.*, 2014). Os efeitos fisiológicos das poliaminas na embriogênese somática ainda continuam pouco elucidados (CHENG *et al.*, 2015; REIS *et al.*, 2016), sendo comumente relacionados à divisão celular (PAUL; MITTER; RAYCHAUDHURI, 2009) e rápido crescimento (KACKAR; SHEKHAWAT, 2007), alongamento celular e desenvolvimento de centros meristemáticos (CVIKROVÁ *et al.*, 1998) e proteção contra o ambiente estressante *in vitro* (REIS *et al.*, 2016).

Tabela 4. Percentagens de oxidação e de calos primários observados aos 90 dias e de calos embriogênicos observados aos 210 dias em meio de indução com 450 µM de Picloram e poliaminas em diferentes concentrações, durante a embriogênese somática em gueroba (*Syagrus oleracea*) a partir de segmentos foliares de plantas germinadas *in vitro*

Tratamentos (µM)	Oxidação (%)	Calo primário (%)	Calo embriogênico (%)
0 poliamina	19,0 ± 4,9 a	33,9 ± 5,9 a	7,1 ± 7,1 a
100 Esp	16,2 ± 5,2 a	35,7 ± 5,7 a	21,9 ± 8,3 a
500 Put	12,4 ± 5,9 a	35,7 ± 4,2 a	4,8 ± 4,8 a
1000 Put	16,2 ± 5,8 a	32,1 ± 4,6 a	4,8 ± 4,8 a
100 Esp + 500 Put	29,5 ± 6,3 a	35,7 ± 4,2 a	10,7 ± 7,4 a
100 Esp + 1000 Put	16,2 ± 4,6 a	30,3 ± 6,0 a	28,6 ± 14,9 a
Médias	18,25	33,93	12,98

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Abreviações: (Esp) Espermidina e (Put) Putrescina. ± Erro padrão

3.2.2 Diferenciação de embriões somáticos

Em meio de diferenciação contendo 40 µM de Picloram, observou-se multiplicação da massa embriogênica, além do desenvolvimento de alguns poucos embriões somáticos (Figura 10A). Após a transferência do material para meio com 20 µM de Picloram, verificou-se o desenvolvimento de vários embriões somáticos em estágio globular (Figuras 10B-D e 11E, F).

Após 30 dias em meio desprovido de auxina e suplementado com diferentes concentrações de BAP e 100 µM de Espermidina + 1000 de µM Putrescina, determinou-se o número de embriões somáticos por tratamento, não sendo verificadas diferenças entre as concentrações testadas (valor médio de 3,7 embriões somáticos/tratamento e um total de 173 embriões somáticos) (Figura 9). Além de embriões somáticos primários,

verificou-se a ocorrência de embriogênese secundária (Figura 10E, F). Embriogênese secundária também tem sido descrita em outras espécies de palmeiras, como *Areca catechu* (WANG; CHEN; CHANG, 2010), *B. gasipaes* (STEINMACHER *et al.*, 2011), *C. merrillii* e *C. subinermis* (GOH *et al.*, 2001), *C. nucifera* (BUFFARD-MOREL; VERDEIL; PANNETIER, 1992; PÉREZ-NÚÑEZ *et al.*, 2006), *E. edulis* (GUERRA; HANDRO, 1991), *E. oleracea* (FREITAS *et al.*, 2016), *E. guineensis* (RAJESH *et al.*, 2003) e *P. dactylifera* (OTHMANI *et al.*, 2009) e apresenta a vantagem adicional de proporcionar a formação de embriões somáticos com melhor desenvolvimento do que aqueles obtidos via embriogênese somática primária (PÉREZ-NÚÑEZ *et al.*, 2006).

A suplementação com BAP promoveu resultados semelhantes aos relacionados por JAYARAJ *et al.* (2015), que obtiveram entre quatro e cinco embriões somáticos por calo derivado de plúmulas de *C. nucifera* em meio suplementado com 22,19 μM de BAP.

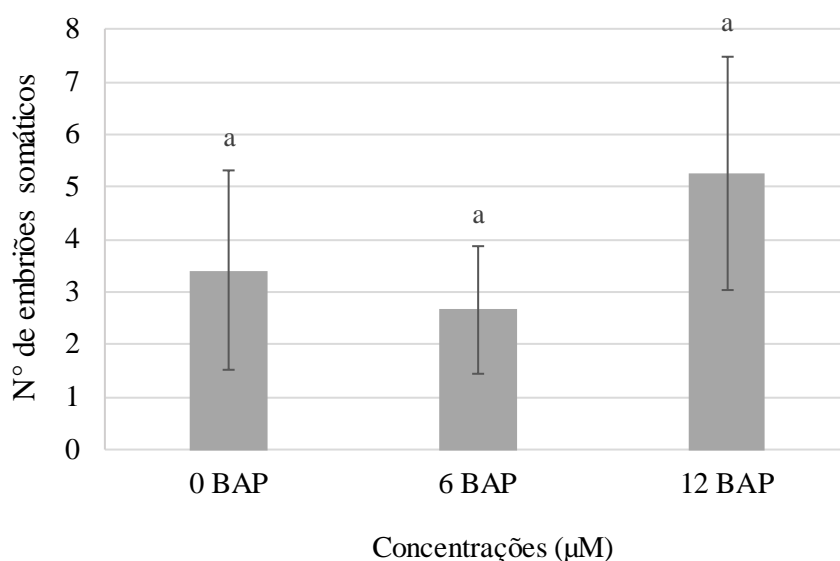


Figura 9. Número médio de embriões somáticos observados aos 30 dias em meio suplementado com diferentes concentrações de BAP e 100 μM de Espermidina + 1000 de μM Putrescina, durante a embriogênese somática em gueroba (*Syagrus oleracea*) a partir de segmentos foliares de plantas germinadas *in vitro*. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam o erro padrão.

A permanência do material em poliaminas promoveu a perda das características embriogênicas de alguns calos, que gradativamente se tornaram amorfos e aquosos. Certamente, o suprimento contínuo com poliaminas (maior concentração de Putrescina) proporciona o incremento da razão Putrescina/Espermidina que é inversamente

proporcional a manutenção das características embriogênicas dos calos e subsequente conversão em embriões somáticos (SANTANEN; SIMOLA, 1992; MINOCHA *et al.*, 1999). Ressalta-se que, necessariamente, a suplementação exógena com Putrescina não aumenta a quantidade de Espermidina (MINOCHA *et al.*, 1993), embora seja sua precursora (BARON; STASOLLA, 2008).

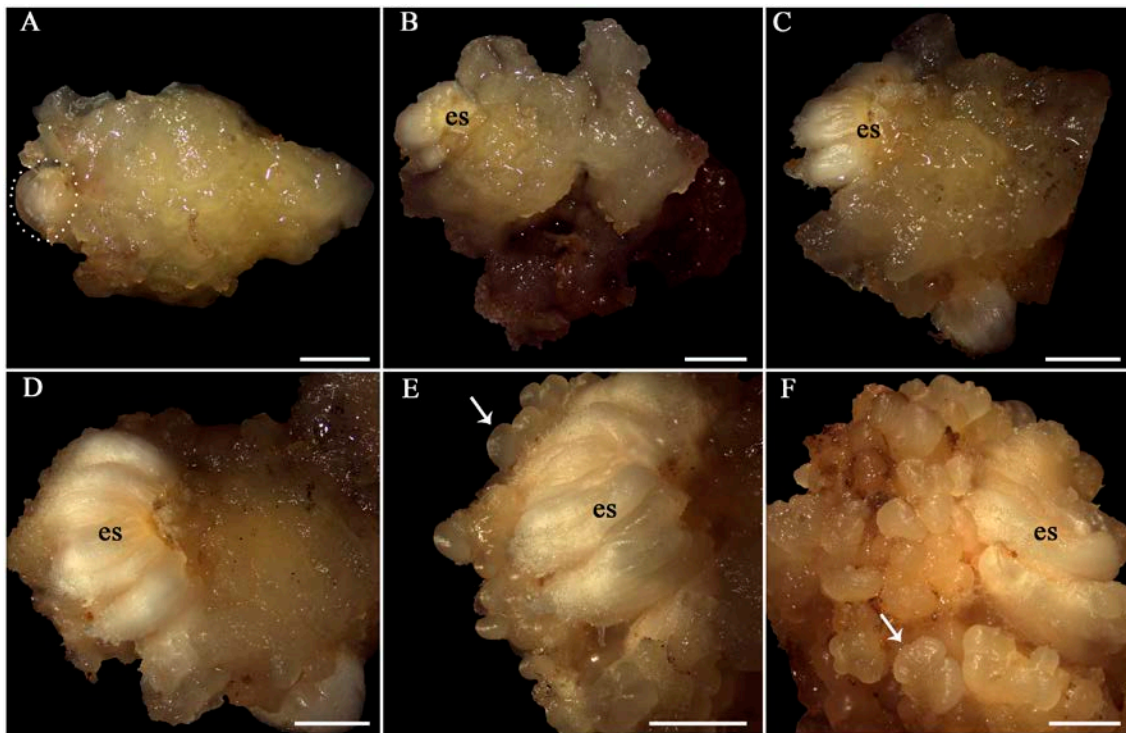


Figura 10. Evolução de embriões somáticos primários e secundários de gueroba (*Syagrus oleracea*) a partir de segmento foliar de planta jovem germinada *in vitro* em meio com poliamina. A: Embriões somáticos (pontilhado) sobre calo mucilaginoso inicial aos 30 dias em meio de diferenciação. B-D: Embriões somáticos em crescimento e fusionados aos 60, 90 e 120 dias em meio de diferenciação. E, F: Desenvolvimento de embriões secundários globulares (setas) aos 150 e 240 dias, respectivamente, em meio de diferenciação. Abreviação: (es) embrião somático. Barras: A-F: 2 mm.

3.2.3 Regeneração de plantas

Dadas as evidências da relação dos baixos níveis de poliaminas e a maturação de embriões somáticos (MINOCHA *et al.*, 1993; CVIKROVÁ *et al.*, 1998; WU *et al.*, 2009; MAURI, MANZANERA *et al.*, 2011), os embriões somáticos obtidos na fase anterior foram transferidos para meio desprovido de poliaminas e acrescido de BAP (0, 6 e 12 μM) e 0,54 μM de ANA, visando o completo desenvolvimento dos embriões somáticos e subsequente germinação, onde permaneceram por 60 dias.

Logo em seguida, os embriões somáticos foram transferidos para meio de regeneração caracterizado por “meia força” de MS ($\frac{1}{2}$ de MS – 50% dos macronutrientes e micronutrientes), desprovido de reguladores de crescimento, suplementado com 30 g.L^{-1} de sacarose e $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de carvão ativado. Após 15 dias nesse meio, observou-se aquisição de coloração branca por parte de alguns embriões somáticos (Figura 11G). Cerca de 60 dias em meio de regeneração, foram observados alguns poucos embriões com alongamento do pecíolo cotiledonar e esverdeamento (Figura 11H). O alongamento do pecíolo cotiledonar indica início do processo germinativo (RIBEIRO; OLIVEIRA; GARCIA, 2012; MAGALHÃES *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013) e está relacionado ao alongamento do eixo embrionário, o que é considerado indicativo de sucesso do processo germinativo zigótico (BEWLEY; BLACK, 1994). Apesar do alongamento verificado em alguns embriões, emissão dos meristemas ainda não foi observada, o que caracteriza um processo germinativo lento. Assincronia e presença de anormalidades (fusionamento) (Figura 11H) também são características típicas do processo germinativo de embriões somáticos de gueroba derivados de segmentos foliares segmentados segundo a técnica TCL.

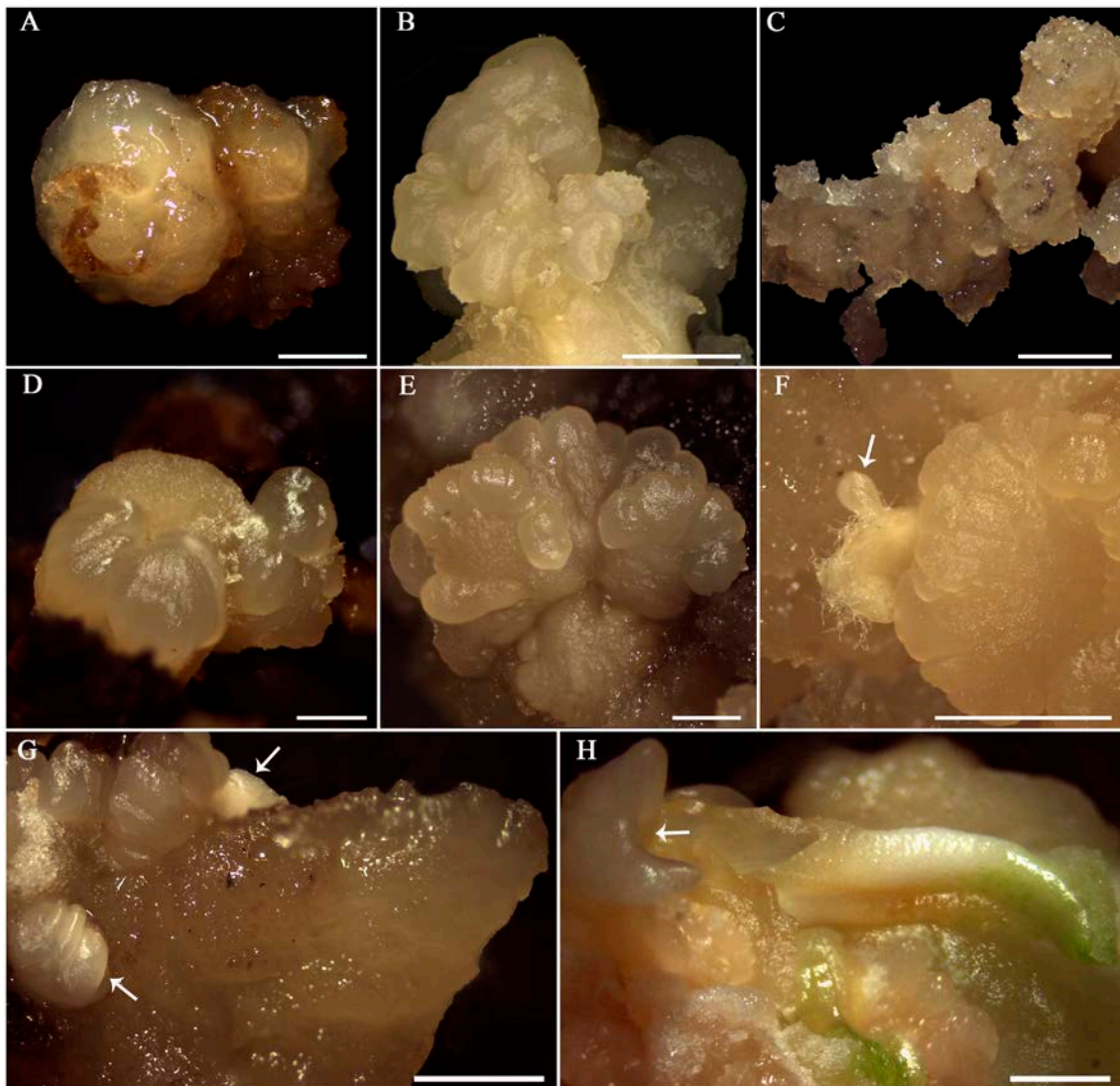


Figura 11. Aspectos da embriogênese somática induzida a partir de segmentos foliares de plantas germinadas *in vitro* de gueroba (*Syagrus oleracea*) em meio suplementado com poliaminas. A: Formações calogênicas mucilaginosas observadas aos 30 dias em meio de indução. B: Calo embriogênico observado aos 120 dias em meio de indução. C: Calo friável observado aos 150 dias em meio de indução. D: *Cluster* de embriões somáticos em estágio globular observado aos 150 dias em meio de indução. E, F: Embriões somáticos observados em meio de diferenciação. G: Embriões somáticos brancos (setas). H: Embrião somático com alongamento do pecíolo cotiledonar e esverdeamento; notar embriões somáticos fusionados (seta). Barras = A-D, G, H: 2 mm e E, F: 1 mm.

3.2.4 Análises anatômica e histoquímica

Uma característica garantida pela técnica *transverse Thin Cell Layer* (sigla em inglês tTCL) consiste na localização *in situ* de células responsivas. Isso só é possível devido a aplicação do conceito de *thin* (explante com o menor número de células responsivas possível) (TRAN THANH VAN, 2003). Neste trabalho identificamos

células relacionadas aos feixes vasculares como responsivas já aos 30 dias de cultivo em meio de indução (Figura 12, 13). Essas células exibiam com vacúolos de diferentes tamanhos, algumas com alta relação núcleo/citoplasma, geralmente, um nucléolo proeminente, paredes celulares mais espessas, reservas (amiloplastos e corpos proteicos) e se encontravam distribuídas em meio a células do mesofilo não reativas, algumas em evidente degradação (Figura 12). Salienta-se que análises anatômicas mais precoces são necessárias para a identificação precisa da origem das células embriogênicas, ou seja, para a identificação da origem procambial (provascular) e/ou parenquimática.

As células responsivas ou embriogênicas estavam embebidas em uma matriz mucilagínosa rica em pectina (fortemente corada com PAS - Figura 12D e 13F), que adquire coloração roxa em corante Azul de Toluidina (Figura 12B, 13B-E) e vermelha em Vermelho de Rutênio (Figura 12F, 13K), e envolvidas por compostos fenólicos não estruturais e/ou lignina (oriunda das paredes dos elementos de vaso) que adquirem coloração esverdeada em Azul de Toluidina (Figura 13B, C).

A mucilagem polissacarídica supracitada, de acordo com Goh *et al.* (2001), é consequente de modificações da lamela média e parede primária celular e é um indicativo de qualidade celular para o desenvolvimento subsequente. Já a presença de compostos fenólicos, apesar dos vários relatos dos efeitos negativos ao cultivo *in vitro* dos produtos da sua oxidação (BHAT; CHANDEL, 1991; NAZ; ALI; IQBAL, 2008; AHMAD *et al.*, 2013), também pode estar relacionada positivamente com a formação de células com potencial embriogênico seja por: potencializar o efeito da auxina adicionada ao meio de indução (ALMEIDA *et al.*, 2012), uma vez que, alguns desses compostos podem estar envolvidos com a regulação de AIA livre (VOLPERT *et al.*, 1995; SCHNABLOVÁ *et al.*, 2006); atuar como antioxidantes (controlando os níveis de espécies reativas de oxigênio) (ZHOU *et al.*, 2016) e/ou ainda por provocar instabilidade nos níveis de metilação de DNA, o que pode ser uma das principais causas de alterações no metabolismo celular necessárias ao desenvolvimento de estruturas embriogênicas partir de células somáticas (DE-LA-PEÑA *et al.*, 2015). Alemanno *et al.* (2003) afirmam que o incremento desses compostos pode ser uma reação de proteção contra as condições estressantes *in vitro* ou uma resposta ao processo de desdiferenciação celular.

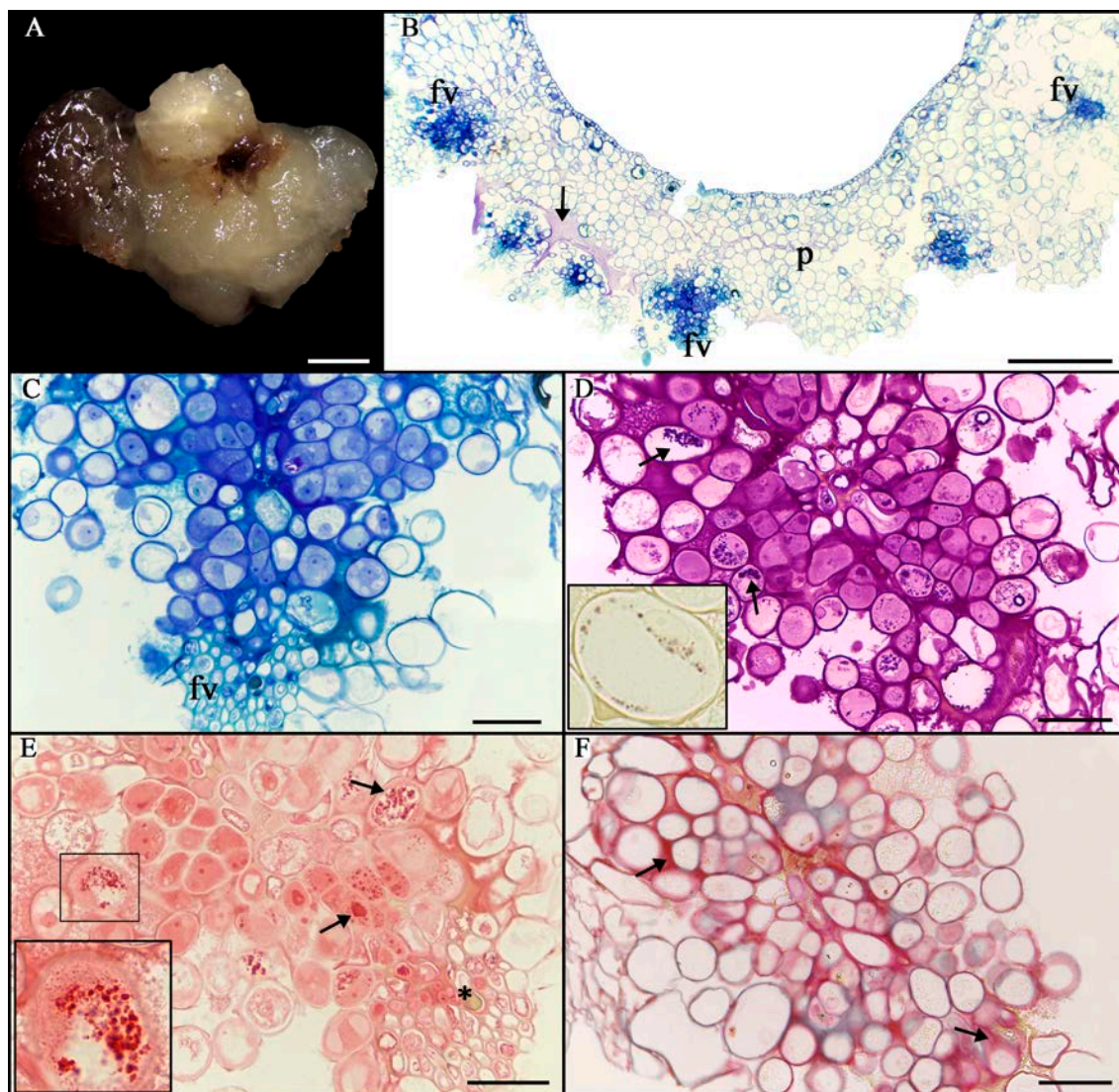


Figura 12. Caracterização morfoanatômica e histoquímica de calo primário desenvolvido a partir de folha imatura de planta germinada *in vitro* de gueroba (*Syagrus oleracea*) utilizada como explante inicial na indução da embriogênese somática. A: Calo primário translúcido, com consistência mucilaginosa (macia e hidratada), verificado sobre explante basal (primeiro explante) após 30 dias em meio de indução. B: Secção transversal de explante basal evidenciando reação de células vasculares; notar mucilagem (seta). C: Células vasculares com características embriogênicas. D: Células vasculares responsivas com amiloplastos corados com reagentes PAS (seta) e Lugol (quadrado lateral); observar intensa coloração com PAS da mucilagem intercelular. E: Células vasculares responsivas com corpos proteicos corados com reagente XP; notar presença de compostos fenólicos (*). F: Matriz mucilaginosa rica em pectina corada de vermelho (setas) com reagente Vermelho de Rutênio. Abreviações: (fv) feixe vascular e (p) parênquima. Barras = A: 2 mm; B: 500 μ m e C- F: 50 μ m.

Algumas dessas células embriogênicas se dividiram assimetricamente e originaram proembriões (Figura 13D, E) com um número variável de células, alguns, inclusive, com nítidos sinais de polarização (Figura 13D). Como evidenciado na Figura

13D, o proembrião exibe uma região caracterizada por células pequenas ricas em citoplasma, nucléos e nucléolos evidentes, enquanto que, a região oposta exibe uma grande célula vacuolada (Figura 13D).

Na reprodução sexuada, o zigoto já exibe sinais nítidos de polarização, antes mesmo da primeira divisão assimétrica ocorrer, com o posicionamento do núcleo na sua porção apical, ao passo que um largo vacúolo se posiciona na porção basal (BAYER; SLANE; JÜRGENS, 2017), embora em monocotiledôneas esse padrão seja menos distinguível (ZHAO *et al.*, 2017). O zigoto geralmente se divide transversal e assimetricamente, dando origem a uma célula apical, a qual por meio de um padrão específico de divisões, originará o embrião propriamente dito, e a uma célula basal, mais larga e vacuolada que se divide transversalmente para formar o suspensor (ZHAO *et al.*, 2017). Na reprodução via embriogênese somática, proembriões com polarização evidente também tem sido relatada, o que confirma o compartilhamento de características comuns com processo zigótico. Halperin e Jensen (1967) descreveram um proembrião com quatro células com sinais típicos de polarização (na camada inferior, uma célula basal larga e vacuolada semelhante a um suspensor, e na camada superior, células com características meristemáticas). Padrão semelhante foi detalhado por Puigderrajols, Mir e Molinaso (2001) em *Quercus suber* L., que consideraram grupos globulares com polaridade estabelecida como um estágio imediatamente antes da diferenciação de embriões somáticos.

Células embriogênicas e proembriões encontravam-se envolvidos por células parenquimáticas aparentemente em degradação. Essas células vacuoladas e com modificações na parede celular (dissolução da lamela média), podem servir como fonte de nutrientes para os proembriões em desenvolvimento (FRANSZ; SCHEL, 1991a; BARCIELA; VIEITEZ, 1993). Ressalta-se que a comprovação histológica da presença de proembriões é um indicativo da ocorrência da origem unicelular de embriões somáticos (KONAR; THOMAS; STREET, 1972; HO; VASIL, 1983; BOTTI; VASIL, 1984; LU; VASIL, 1985; MICHAUX-FERRIÈRE; GROUT; CARRON, 1992; ALEMANN; BERTHOULY; MICHAUX-FERRIÈRE, 1996; GRAPIN; SCHWENDIMAN; TEISSON, 1996; GOH *et al.*, 2001; VERDEIL *et al.*, 2001; MOURA *et al.*, 2008).

As análises histoquímicas revelaram a presença de grãos de amido conspícuos nas células embriogênicas e nos consequentes proembriões (Figura 12D e 13F-H), diferente do relatado por outros autores (VERDEIL *et al.*, 2001; GOH *et al.*, 2001;

MOURA *et al.*, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2012), mas em concordância com Alizadeh e Mantell (1991), que verificaram amido nas camadas superficiais de proembriões. Dada a variabilidade de resultados com relação a presença ou ausência de amido em células embriogênicas, vários autores concordam entre si, que o acúmulo de grãos de amido não pode ser considerado um marcador histoquímico do processo de embriogênese somática (SCHWENDIMAN; PANNETIER; MICHAUX-FERRIERE, 1988; BARCIELA; VIEITEZ, 1993; STEINMACHER *et al.*, 2011) e sua função durante o processo de embriogênese somática ainda não foi totalmente elucidada (MOURA *et al.*, 2008; ROCHA *et al.*, 2012; ROCHA *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Além de amido, corpos proteicos conspícuos também foram visualizados nas células embriogênicas (Figura 12E e 13I), porém em quantidades irrisórias nos proembriões (Figura 13J). De acordo com Berthouly e Michaux-Ferriere (1996) e Cangahuala-Inocente *et al.* (2004), a presença de corpos proteicos está associada com a subsequente formação de grupos de células proembriogênicas (tecidos embriogênicos), o que corrobora com os resultados obtidos aqui.

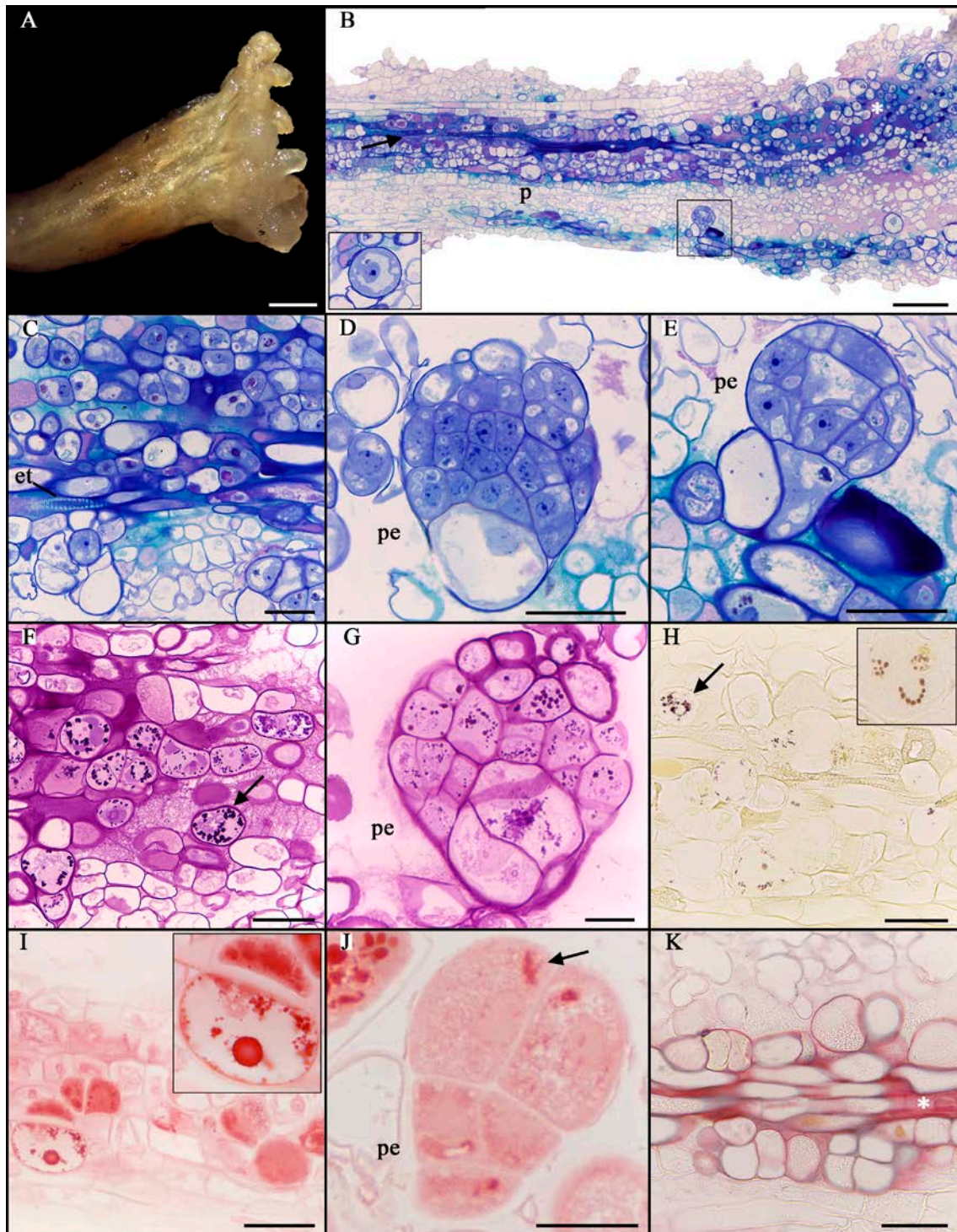


Figura 13. Caracterização morfoanatômica e histoquímica de explante foliar de planta germinada *in vitro* de guerobera (*Syagrus oleracea*), com início de calo mucilaginoso aos 45 dias em meio de indução. A: Explante foliar com indícios de calos. B: Secção longitudinal de explante foliar, evidenciando reatividade de células do feixe vascular (elemento de vaso indicado por seta) e formação de proembriões (quadrado); atentar-se a mucilagem corada de roxo (*) e detalhe de célula embriogênica (quadrado lateral). C: Detalhe da secção mencionada na letra B. D, E: Proembriões com indícios de polarização. F: Células vasculares responsivas com amiloplastos (seta) corados com reagentes PAS; observar intensa coloração da mucilagem intercelular com PAS. G: Proembrião com grãos de amido corados com reagente PAS. H: Células vasculares

responsivas com grãos de amido (seta) corados com reagente Lugol. I: Células vasculares responsivas com corpos proteicos corados com reagente XP. J: Proembrião com resquício de proteína corado com XP. K: Matriz mucilaginosa rica em pectina corada de vermelho (*) com reagente Vermelho de Rutênio. Abreviações: (et) elemento traqueal, (p) parênquima e (pe) proembrião. Barras = A: 2 mm; B: 200 µm; C, D, E, F, I, H, K: 50 µm e G, J: 20 µm.

Com 120 dias em meio de indução, observou-se a formação de calos embriogênicos em todos os tratamentos com poliaminas. Tais calos, de modo geral, exibiam formato nodular, consistência compacta, coloração variando entre bege e amarelo, e superfície lisa e brilhosa (Figura 13). Anatomicamente, essas formações calogênicas foram caracterizadas pela presença de uma zona periférica, contendo células com características meristemáticas em intensa divisão celular, e por uma zona mais interna, compreendendo células parenquimáticas com vacuolação variável (Figura 13). Conforme as análises histoquímicas, a presença de grãos de amido conspícuos foi observada nas células adjacentes àquelas em intensa divisão celular (Figura 13E, F), provavelmente, subsidiando-as em termos energéticos, padrão também visualizado por Plata, Ballester e Vieitez (1991).

Algumas dessas estruturas exibiam uma camada de células, resultante de divisões anticliniais, muito semelhante a uma protoderme em formação (Figura 13C), o que sugere a origem multicelular de embriões somáticos (provável quebra de massas meristemáticas que adquirem protoderme). Além do mais, sobre a zona meristemática periférica, também foi possível notar a multiplicação de células com evidente vacuolação, a partir das quais, se observaram embriões somáticos de origem unicelular, dada a presença de uma região semelhante a um suspensor anexada ao calo (Figura 13D). A ocorrência das duas vias em um mesmo sistema de regeneração também foi reportada em *B. gasipaes* (ALMEIDA *et al.*, 2012), *E. oleracea* (SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2012) e *P. dactylifera* (SANÉ *et al.*, 2006).

Vale salientar que durante a formação de embriões somáticos, na maioria das espécies de plantas, com exceção das coníferas, o suspensor, geralmente não é de fácil visualização ou, simplesmente, não é formado (WINKELMANN, 2016). Porém, vários são os relatos da formação de embriões somáticos com estruturas semelhantes a um suspensor em diferentes palmeiras (GUERRA; HANDRO, 1998; ALMEIDA *et al.*, 2012; SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2012; LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2014; FREITAS *et al.*, 2016).

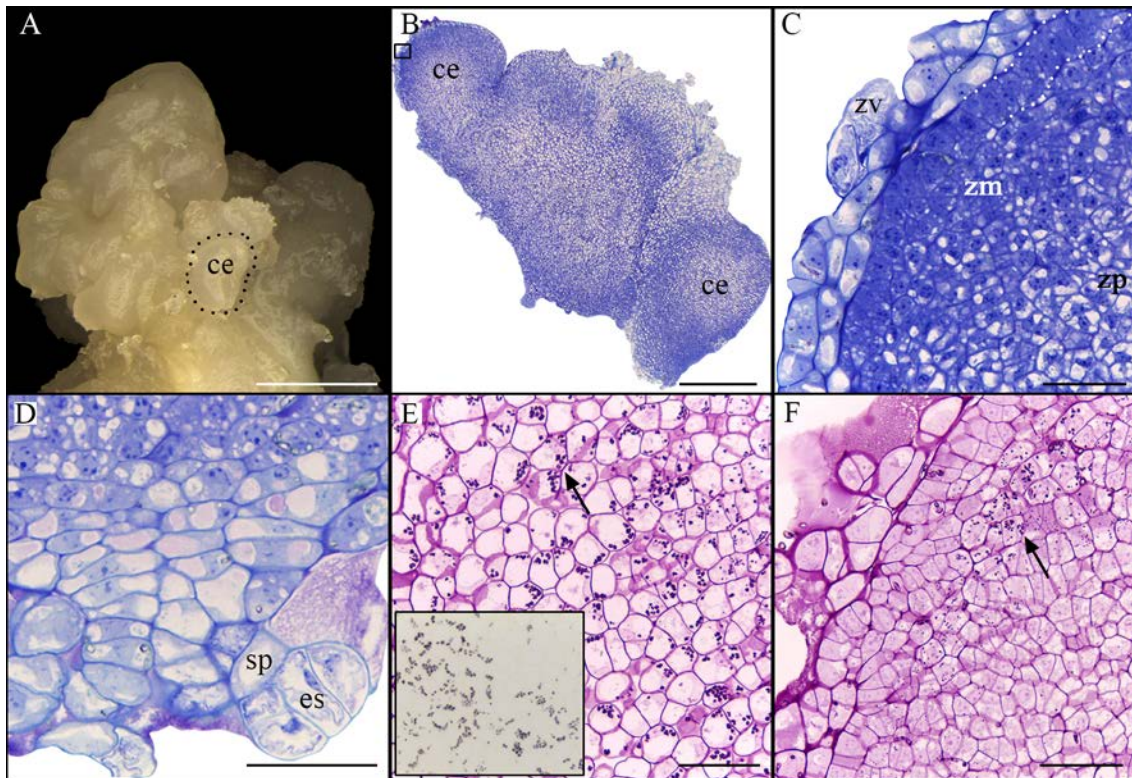


Figura 14. Caracterização morfoanatômica e histoquímica de calos embriogênicos desenvolvidos a partir de folhas imaturas de planta jovem germinada *in vitro* de gueroba (*Syagrus oleracea*). A: Calo embriogênico verificado após 120 dias em meio de indução. B: Secção anatômica de calo embriogênico. C: Detalhe de zona periférica vacuolada, periférica meristemática e zona interna com características parenquimáticas; observar provável protoderme em formação (pontilhado). D: Embrião somático de origem unicelular surgindo na periferia de calo embriogênico. E, F: Grãos de amido (setas) corados com reagente PAS localizados nas adjacências de células em intensa divisão celular; notar grãos de amido corados com Lugol (quadrado). Abreviações: (ce) calo embriogênico, (es) embrião somático, (sp) supensor, (zm) zona meristemática, (zp) zona parenquimática e (zv) zona vacuolada. Barras = A: 2 mm; B: 500 μ M e C-F: 50 μ M.

4. CONCLUSÕES

- A embriogênese somática a partir de explantes foliares provenientes de plantas jovens germinadas *in vitro* de *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc. (gueroba), sob as condições de estudo, segue um modelo indireto.
- A auxina Picloram é eficiente na produção de calos de *S. oleracea* (volume satisfatório e qualidade de calos) via explantes foliares de plantas germinada *in vitro*.
- Poliaminas exógenas não são decisivas na formação de calos embriogênicos, a partir de explantes foliares de plantas germinada *in vitro* em *S. oleracea*.
- Anatomicamente, a origem dos calos de *S. oleracea* foi relacionada aos tecidos vasculares.
- O processo de embriogênese somática a partir de explantes foliares de plantas germinada *in vitro* de *S. oleracea* é lento, assicrônico e com anormalidades evidentes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADKINS, S. W.; SAMOSIR, Y. M.; ERNAWATI, A.; GODWIN, I. D.; DREW, R. A. Control of ethylene and use of polyamines can optimise the conditions for somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.) and papaya (*Carica papaya* L.). **Acta Horticulturae (ISHS)**, v. 461, p. 459-466, 1998.
- 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. La multiplication végétative in vitro du palmier à huile par embryogenèse somatique. **Oléagineux**, v. 36, n. 3, p. 113 - 118, 1981.
- AHMAD, I.; HUSSAIN, T.; ASHRAF, I.; NAFEES, M.; MARYAM; RAFAY, M.; IQBAL, M. Lethal effects of secondary metabolites on plant tissue culture. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v. 13, n. 4, p. 539-547, 2013.
- AHMADI, B.; SHARIATPANAH, M. E.; OJAGHKANDI, M. A.; HEYDARI, A. A. Improved microspore embryogenesis induction and plantlet regeneration using putrescine, cefotaxime and vancomycin in *Brassica napus* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, n. 3, p. 497-505, 2014.
- AHN, I. O.; BUI VAN LE, GENDY, C.; TRAN THANH VAN, K. Direct somatic embryogenesis through thin cell layer culture in *Panax ginseng*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 45, p. 237-243, 1996.
- ALEMANN, L.; BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIÈRE, N. Histology of somatic embryogenesis from floral tissues cocoa. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 46, p. 187-194, 1996.
- ALEMANN, L.; RAMOS, T.; GARGADENEC, A.; ANDARY, C.; FERRIERE, N. Localization and identification of phenolic compounds in *Theobroma cacao* L. somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, v. 92, n. 4, p. 613-623, 2003.
- ALIZADEH, S.; MANTELL, S. H. Early cellular events during direct somatic embryogenesis in cotyledon explants of *Solatum aviculare* Forst. **Annals of Botany**, v. 67, p. 257-263, 1991.
- ALMEIDA, M.; ALMEIDA, C. V.; GRANER, E. M.; BRONDANI, G. E.; ABREU-TARAZI, M. F. Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study. **Plant Cell Reports**, v. 31, p. 1495-1515, 2012.
- BARCIELA, J.; VIEITEZ, A. M. Anatomical sequence and morphometric analysis during somatic embryogenesis on cultured cotyledon explants of *Camellia japonica* L. **Annals of Botany**, v. 71, n. 5, p. 395-404, 1993.

- BARON, K.; STASOLLA, C. The role of polyamines during *in vivo* and *in vitro* development. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 44, p. 384-395, 2008.
- BAYER, M.; SLANE, D.; JÜRGENS, G. Early plant embryogenesis - dark ages or dark matter. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 35, p. 30-36, 2017.
- BENELLI, C.; FABBRI, A.; GRASSI, S.; LAMBARDI, M.; RUGINI, E. Histology of somatic embryogenesis in mature tissues of olive (*Olea europaea* L.). **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 112-119, 2001.
- BENKIRANE, H.; SABOUNJI, K.; CHLYAH, A.; CHLYAH, H. Somatic embryogenesis and plant regeneration from fragments of immature inflorescences and coleoptiles of durum wheat. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 61, p. 107-113, 2001.
- BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIERE, N. M. High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 44, p. 169-176, 1996.
- BERTOLDI, D.; TASSONI, A.; MARTINELLI, L.; BAGNI, N. Polyamines and somatic embryogenesis in two *Vitis vinifera* cultivars. **Physiologia Plantarum**, v. 120, p. 657-666, 2004.
- BETTENCOURT, G. M. F.; ZANELLA, L. B.; QUOIRIN, M. G. G.; DEGENHARDT-GOLDBACH, J. Efeito da fonte de carbono na embriogênese somática em *Bactris gasipaes*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 36, n. 86, p. 179-183, 2016.
- BHAT, S. R.; CHANDEL, K. P. S. A novel technique to overcome browning in tissue culture. **Plant Cell Reports**, v. 10, 358-361, 1991.
- BONETTI, K. A. P.; NESI, J.; QUISEN, R. C.; QUOIRIN, M. Somatic embryogenesis from zygotic embryos and thin cell layers (TCLs) of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* × *Elaeis oleifera*). **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 37, p. 2028-2037, 2016.
- BONGA, J. M. Can explant choice help resolve recalcitrance problems in in vitro propagation, a problem still acute especially for adult conifers? **Trees**, p. 1-9, 2016.
- BOTTI, C.; VASIL, I. K. Ontogeny of somatic embryos of *Pennisetum americanum*. II. In cultured immature inflorescences. **Canadian Journal of Botany**, v. 62, p. 1629-1635, 1984.
- BRISIBE, E. A.; NISHIOKA, D.; MIYAKE, H.; TANIGUCHI, T.; MAEDA, E. Developmental electron microscopy and histochemistry of somatic embryo differentiation in sugarcane. **Plant Science**, v. 89, p. 85-92, 1993.
- BUFFARD-MOREL, J.; VERDEIL, J.-L.; PANNETIER, C. Embryogénese somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) à partir d'explants foliaires: étude histologique. **Canadian Journal of Botany**, v. 70, p. 735-741, 1992.

BUI VAN LE; THAO, DO MY N.; GENDY, C; VIDAL, J.; TRAN THANH VAN, K. Somatic embryogenesis on Thin Cell Layers of a C4 species, *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 49, p. 201-208, 1997.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; STEINER, N.; SANTOS, M.; GUERRA, M. P. Morphohistological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. **Protoplasma**, v. 224, p. 33-40, 2004.

CHENG, W.-H.; WANG, F.-L.; CHENG, X.-Q.; ZHU, Q.-H.; SUN, Y.-Q.; ZHU, H.-G.; SUN, J. Polyamine and its metabolite H₂O₂ play a key role in the conversion of embryogenic callus into somatic embryos in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 1063, 2015.

COMPTON, M. E. Dark pretreatment improves adventitious shoot organogenesis from cotyledons of diploid watermelon. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 58, p. 185-188, 1999.

CORRÊA, T. R.; MOTOIKE, S. Y.; ANDRADE, A. P. S.; COSER, S. M.; QUEIROZ, V.; GRANJA, M. M. C.; CAETANO, D. D. N.; PEÑA, C. N. M.; PICOLI, E. A. T. Accelerated *in vitro* propagation of elite oil palm genotypes (*Elaeis guineensis* Jacq.) by substituting cytokinin with putrescine. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 50, p. 2767-2775, 2016.

CORREIA, S. M.; CANHOTO, J. M. Characterization of somatic embryo attached structures in *Feijoa sellowiana* Berg. (Myrtaceae). **Protoplasma**, v. 242, p. 95-107, 2010.

CROUCH, M. L. Non-zygotic embryos of *Brassica napus* L. contain embryo-specific storage proteins. **Planta**, n. 156, p. 520-524, 1982.

CURRIER, H. B. Callose substances in plant cells. **American Journal of Botany**, v. 44, n. 6, pp. 478-488, 1957.

CVIKROVÁ, M.; MALÁ, J.; JOSEF, E.; HRUBCOVZÁ, M.; VÁGNER, M. Abscisic acid, polyamines and phenolic acids in sessile oak somatic embryos in relation to their conversion potential. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 36, n. 3, p. 247-255, 1998.

DE-LA-PEÑA, C.; NIC-CAN, G. I.; GALAZ-ÁVALOS, R. M.; AVILEZ-MONTALVO, R.; LOYOLA-VARGAS, V. M. The role of chromatin modifications in somatic embryogenesis in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 635, 2015.

DELPORTE, F.; MOSTADE, O.; JACQUEMIN, J. M. Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 67, p. 73-80, 2001.

DELPORTE, F.; PRETOVA, A.; JARDIN, P.; WATILLON, B. Morpho-histology and genotype dependence of *in vitro* morphogenesis in mature embryo cultures. **Protoplasma**, v. 251, n. 6, p. 1455-1470, 2014.

DUBOIS, T. M.; GUEDIRA, J.; DUBOIS, J.; VASSEUR, J. Direct somatic embryogenesis in roots of *Cichorium*: as callose an early marker? **Annals of Botany**, v. 65, p. 539-545, 1990.

EEUWENS, C. J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants Excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v. 36, p. 23-28, 1976.

EL BAR, O. H. A.; EL DAWAYATI, M. M. Histological changes on regeneration *in vitro* culture of date palm (*Phoenix dactylifera*) leaf explants. **Australian Journal of Crop Science**, v. 8, n. 6, p. 848-855, 2014.

ESCHRICH, W.; CURRIER, H. B. Identification of callose by its diachrome andfluorochrome reactions. **Stain Technology**, v. 39, p. 303-307, 1964.

FEHÉR, A. Somatic embryogenesis – stress-induced remodeling of plant cell fate. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1849, n. 4, p. 385-402, 2015.

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

FOBERT, P. A.; WEBB, D. T. Effects of polyamines, polyamine precursors, and polyamine biosynthetic inhibitors on somatic embryogenesis from eggplant (*Solanum melongena*) cotyledons. **Canadian Journal of Botany**, v. 66, n. 9, p. 1734-1742, 1988.

FRANSZ, P. F.; SCHEL, J. H. N. An ultrastructural study on the early development of *Zea mays* somatic embryos. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, p. 858-865, 1991a.

FRANSZ, P. F.; SCHEL, J. H. N. Cytodifferentiation during the development of friable embryogenic callus of maize (*Zea mays*). **Canadian Journal of Botany**, v. 69, p. 26-33, 1991b.

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.

GENOVESE-MARCOMINI, P. R.; MENDONÇA, M. S.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. Embryonic development of *Syagrus inajai* (Spruce) Becc. (Arecaceae, Arcoideae), an Amazonian. **Australian Journal of Botany**, v. 61, p. 611-621, 2013.

GOH, D. K. S.; BON, 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, p. 375-381, 2001.

GRAPIN, A.; SCHWENDIMAN, J.; TEISSON, C. Somatic embryogenesis in plantain banana. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 32, p. 66-71, 1996.

GRIMAUULT, V.; HELLEBOID, S.; VASSEUR, J.; HILBERT, J.-L. co-localization of β -1,3-glucanases and callose during somatic embryogenesis in *Cichorium*. **Plant Signaling & Behavior**, v. 2, n. 6, p. 455-461, 2007.

GRZYB, M.; KALANDYK, A.; WALIGÓRSKI, P.; MIKUŁA, A. The content of endogenous hormones and sugars in the process of early somatic embryogenesis in the tree fern *Cyathea delgadii* Sternb. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 129, n. 3, p. 387-397, 2017.

GUEDES, R. S.; SILVA, T. L.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. N. Initial requirements for embryogenic calluses initiation in thin cell layers explants from immature female oil palm inflorescences. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 52, p. 10774-10780, 2011.

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

GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae): Control and Structural Features. **Journal of Plant Research**, v. 111, p. 65-71, 1998.

GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis in tissue cultures of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). In: AHUJA, M. R. (Ed.). **Woody Plant Biotechnology**. New York: Plenwn Press, 1991. p. 189-196.

GUEYE, B.; MORCILLO, F.; COLLIN, M.; GARGANI, D.; OVERVOORDE, P.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; VERDEIL, J. L. Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2,4-D treatment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 99, p. 35-45, 2009a.

GUEYE, B.; SAÏD-AHMED, H.; MORCILLO, F.; BORGEL, A.; SANE, D.; HILBERT, J.-L.; VERDEIL, J.-L.; BLERVACQ, A.-S. Callogenesis and rhizogenesis in date palm leaf segments: are there similarities between the two auxin-induced. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 98, p. 47-58, 2009b.

HALPERIN, W.; JENSEN, W. A. Ultrastructural changes during growth and embryogenesis in carrot cell cultures. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 18, p. 428-443, 1967.

HEGAZY, A. E.; ABOSHAMA, H. M. An efficient novel pathway discovered in date palm micropropagation. **Acta Horticulturae**, v. 882, p. 167-176, 2010.

HO, W.-J.; VASIL, I. K. Somatic Embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) I. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. **Protoplasma**, v. 118, p. 69-180, 1983.

JALIL, M.; CHEE, W. W.; OTHMAN, R. Y.; KHALID, N. Morphohistological examination on somatic embryogenesis of *Musa acuminata* cv. Mas (AA). **Scientia Horticulturae**, v. 117, p. 335-340, 2008.

JARITEH, M.; EBRAHIMZADEH, H.; NIKNAM, V.; MIRMASOUMI, M.; VAHDATI, K. Developmental changes of protein, proline and some antioxidant enzymes activities in somatic and zygotic embryos of Persian walnut (*Juglans regia* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 122, p. 101-115, 2015.

JAYARAJ, K. L.; BHAVYASHREE, U.; FAYAS, T. P.; SAJINI, K. K.; RAJESH, M.K.; KARUN, A. Histological studies of cellular differentiation during somatic embryogenesis of coconut plumule-derived calli. **Journal of Plantation Crops**, v. 43, n. 3, p. 196-203, 2015.

JOHANSEN, D. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill, 523 p. 1940.

JONG, A. J.; CORDEWENER, J.; SCHIAVO, F.; TERZI, M.; VANDEKERCKHOVE, J.; KAMMEN, A. V.; VRIES, S. C. A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. **The Plant Cell**, v. 4, p. 425-433, 1992.

KACKAR, A.; SHEKHAWAT, N. S. Plant regeneration through somatic embryogenesis and polyamine levels in cultures of grasses of Thar Desert. **Journal of Cell and Molecular Biology**, v. 6, n. 2, p. 121-127, 2007.

KARNOVSKY, M. J. A. formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137-138, 1965.

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, p. 1623-1628, 2004.

KEVERS, C.; GAL, N. L.; MONTEIRO, M.; DOMMES, J.; GASPAR, T. Somatic embryogenesis of *Panax ginseng* in liquid cultures: a role for polyamines and their metabolic pathways. **Plant Growth Regulation**, v. 31, p. 209-214, 2000.

KONAR, R. N.; THOMAS, E.; STREET, H. E. Origin and structure of embryoids arising from epidermal cells of the stem of *Ranunculus sceleratus* L. **Journal of Cell Science**, p. 77-93, 1972.

KONIECZNY, R.; SLIWINSKA, E.; PILARSKA, M.; TULEJA, M. Morphohistological and flow cytometric analyses of somatic embryogenesis in *Trifolium nigrescens* Viv. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 109, p. 131-141, 2012.

LITZ, R. E.; SCHAFFER, B. Polyamines in adventitious and somatic embryogenesis in mango (*Mangifera indica* L.). **Journal of Plant Physiology**, v. 128, p. 251-258, 1987.

LU, C. Y.; VASIL, I. K. Histology of somatic embryogenesis in *Panicum maximum* (Guinea grass). **American Journal of Botany**, v. 72, p. 1908-1913, 1985.

LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. An improved protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from

mature zygotic embryos. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 118, p. 485-496, 2014.

MAGALHÃES, H. M.; LOPES, P. S. N.; RIBEIRO, L. M.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; OLIVEIRA, D. M. T. Structure of the zygotic embryos and seedlings of *Butia capitata* (Arecaceae). **Trees**, v. 27, p. 273-283, 2013.

MALÁ, J.; CVIKROVÁ, M.; MÁCHOVÁ, P.; MARTINCOVÁ, O. Polyamines during somatic embryo development in Norway spruce (*Picea abies* [L.]). **Journal of Forest Science**, v. 55, n. 2, p. 75-80, 2009.

MAURI, P. V.; MANZANERA, J. A. Somatic embryogenesis of holm oak (*Quercus ilex* L.): ethylene production and polyamine content. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, p. 717-723, 2011.

MAZRI, M. A.; BELKOURA, I.; PLIEGO-ALFARO, F.; BELKOURA, M. Somatic embryogenesis from leaf and petiole explants of the Moroccan olive cultivar Dahbia. **Scientia Horticulturae**, v. 159, p. 88-95, 2013.

MICHAUX-FERRIÈRE, N.; GROUT, H.; CARRON, M. P. Origin and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae). **American Journal of Botany**, v. 79, n. 2, p. 174-180, 1992.

MIHALJEVIC, S.; RADIC, S.; BAUER, N.; GARIC, R.; MIHALJEVIC, B.; HORVAT, G.; LELJAK-LEVANIC, D.; JELASKA, S. Ammonium-related metabolic changes affect somatic embryogenesis in pumpkin (*Cucurbita pepo* L.). **Journal of Plant Physiology**, v. 168, p. 1943-1951, 2011.

MILOJEVIĆ, J.; TUBIC, L.; PAVLOVIC, S.; MITIC, N.; CALIC, D.; VINTERHALTERA, B.; ZDRAVKOVIC-KORAC, S. Long days promote somatic embryogenesis in spinach. **Scientia Horticulturae**, v. 142, p. 32-37, 2012.

MINOCHA, R.; KVAALLEN, H.; MINOCHA, S. C.; LONG, S. Polyamines in embryogenic cultures of Norway spruce (*Picea abies*) and red spruce (*Picea rubens*). **Tree Physiology**, v. 13, p. 365-371, 1993.

MINOCHA, R.; SMITH, D. R.; REEVES, C.; STEELE, K. D.; MINOCHAD, S. C. Polyamine levels during the development of zygotic and somatic embryos of *Pinus radiata*. **Physiologia Plantarum**, v. 105, p. 155-164, 1999.

MONTAGUE, M. J.; KOPPENBRINK, J. W.; JAWORSKI, E. G. Polyamine metabolism in embryogenic cells of *Daucus carota*. I. Changes in intracellular content and rates of synthesis. **Plant Physiology**, v. 62, p. 430-433, 1978.

MONTORO, P.; ETIENNE, H.; MICHAUX-FERRIÈRE, N.; CARRON, M.-P. Callus friability and somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 33, p. 331-338, 1993.

MOON, H.-K.; LEE, H.; PAEK, K.-Y.; PARK, S.-Y. Osmotic stress and strong 2,4-D shock stimulate somatic-to-embryogenic transition in *Kalopanax septemlobus* (Thunb.) Koidz. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, n. 1710, 2015.

MORCILLO, F.; ABERLENC-BERTOSI, F.; HAMON, S.; DUVAL, Y. Accumulation of storage protein and 7s globulins during zygotic and somatic embryo development in *Elaeis guineensis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 36, n. 7, p. 509-514, 1998.

MOTOIKE, S. Y.; SARAIVA, E. A.; VENTRELLA, M. C.; SILVA, C. V.; SALOMÃO, L. C. C. Somatic embryogenesis of *Myrciaria aureana* (Brazilian grape tree). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 89, p. 75-81, 2007.

MOURA, E. F.; VENTRELLA, M. C.; MOTOIKE, S. Y.; DE SÁ JUNIOR, 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, 175-184, 2008.

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

NAZ, S.; ALI, A.; IQBAL, J. Phenolic content *in vitro* cultures of chick pea (*Cicer arietinum* L.) during callogenesis and organogenesis. **Pakistan Journal of Botany**, v. 40, n. 6, p. 2525-2539, 2008.

NICKLE, T. C.; YEUNG, E. C. Failure to establish a functional shoot meristem may be a cause of conversion failure in somatic embryos of *Daucus carota* (Apiaceae). **American Journal of Botany**, v. 80, n. 11, p. 1284-129, 1993.

O'BRIEN T. P.; MCCYLLY, M. E. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Melbourne: Termarcarphi PTY. LTD, 1981.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCYLLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, p. 368-373, 1964.

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. Morpho-histological, histochemical, and molecular evidences related to cellular reprogramming during somatic embryogenesis of the model grass *Brachypodium distachyon*. **Protoplasma**, p. 1-18, 2017.

OLIVEIRA, N. C. C.; LOPES, P. S. N.; RIBEIRO, L. M.; MERCANDANTE-SIMÕES, M. O.; OLIVEIRA, L. A. A.; SILVÉRIO, F. O. Seed structure, germination, and reserve mobilization in *Butia capitata* (Arecaceae). **Trees**, v. 27, p. 1633-1645, 2013.

OTHMANI, A. C.; BAYOUDH, C.; DRIRA, N.; MARRAKCHI, M.; TRIFI, M. 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**, v. 97, p. 71-79, 2009.

PADILHA, J. H. D.; RIBAS, L. L. F.; AMANO, E.; QUOIRIN, M. Somatic embryogenesis in *Acrocomia aculeata* Jacq. (Lodd.) ex Mart using the thin cell layer technique. **Acta Botanica Brasilica**, v. 29, n. 4, p. 516-523, 2015.

PÁDUA, M. S.; SANTOS, R. S.; LABORY, C. R. G.; STEIN, V. C.; MENDONÇA, E. G.; ALVES, E.; PAIVA, L. V. Histodifferentiation of oil palm somatic embryo development at low auxin concentration. **Protoplasma**, p. 1-11, 2017.

PÁDUA, V. I. M.; FERNANDES, I. D.; DE OLIVEIRA, D. E.; MANSUR, E. Effects of auxin and light treatments of donor plants on shoot production from indica-type rice (*Oryza sativa* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant**, v. 34, n. 4, p. 285-288, 1998.

PAUL, A.; MITTER, K.; RAYCHAUDHURI, S. S. Effect of polyamines on *in vitro* somatic embryogenesis in *Momordica charantia* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 97, p. 303-311, 2009.

PÉREZ-NÚÑEZ, M. T.; CHAN, J. L.; SÁENZ, L.; GONZÁLEZ, 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.

PINTO, G.; SILVA, S.; NEVES, L.; ARAUÚJO, C.; SANTOS, C. Histocytological changes and reserve accumulation during somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus*. **Trees**, v. 24, p. 763-769, 2010.

PLATA, E.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, A. M. An anatomical study of secondary embryogenesis in *Camellia reticulata*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 27, p. 183-189, 1991.

PROFUMO, P.; GASTALDO, P.; RASCIO, N. Ultrastructural study of different types of callus from leaf explants of *Aesculus hippocastanum* L. **Protoplasma**, v. 138, p. 89-97, 1987.

PUIGDERRAJOLS, P.; MIR, G.; MOLINAS, M. Ultrastructure of early secondary embryogenesis by multicellular and unicellular pathways in cork oak (*Quercus suber* L.). **Annals of Botany**, v. 87, p. 179-189, 2001.

QUIROZ-FIGUEROA, F. R.; FUENTES-CERDA, C. F. J.; ROJAS-HERRERA, R.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 1141-1149, 2002.

R CORE TEAM (2015). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em: 28 jan 2015.

RAJESH, M. K.; RADHA, E.; KARUN, A.; PARTHASARATHY, V. A. Plant regeneration from embryo-derived callus of oil palm – the effect of exogenous polyamines. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 75, p. 41-47, 2003.

RAJESH, M. K.; RADHA, E.; SAJINI, K. K.; KARUN, A. Polyamine-induced somatic embryogenesis and plantlet regeneration in vitro from plumular explants of dwarf cultivars of coconut (*Cocos nucifera*). **The Indian Journal of Agricultural Sciences**, v.84, n. 4, p. 527-530, 2014.

REIS, R. S.; VALE, E. M.; HERINGER, A. S.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V. Putrescine induces somatic embryo development and proteomic changes in embryogenic callus of sugarcane. **Journal of Proteomics**, v. 130, p. 170-179, 2016.

REUVENI, M.; EVENOR, D. On the effect of light on shoot regeneration in petunia. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 89, p. 49-54, 2007.

RIBEIRO, L. M.; OLIVEIRA, D. M. T.; GARCIA, Q. S. Structural evaluations of zygotic embryos and seedlings of the macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae) during *in vitro* germination. **Trees**, v. 26, p. 851-863, 2012.

ROCHA, D. I. R.; PINTO, D. L. P.; VIEIRA, L. M.; TANAKA, F. A. O.; DORNELAS, M. C.; OTONI, W. C. Cellular and molecular changes associated with competence acquisition during passion fruit somatic embryogenesis: ultrastructural characterization and analysis of SERK gene expression. **Protoplasma**, v. 253, n. 2, p. 595-609, 2016.

ROCHA, D. I.; VIEIRA, L. M.; TANAKA, F. A. O.; SILVA, L. C.; OTONI, W. C. Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. **Protoplasma**, v. 249, p. 747-758, 2012.

RODRIGUEZ, A. P. M.; WETZSTEIN, H. Y. A morphological and histological comparison of the initiation and development of pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryogenic cultures induced with naphthaleneacetic acid or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Protoplasma**, v. 204, p. 71-83, 1998.

SAÉNZ, L.; AZPEITIA, A.; CHUC-ARMENDARIZ, B.; CHAND, 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.

SAMAJ, J.; BALUSKA, F.; BOBÁK, M.; VOLKMANN, D. Extracellular matrix surface network of embryogenic units of friable maize callus contains arabinogalactan-proteins recognized by monoclonal antibody JIM4. **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 369-374, 1999.

SAMOSIR, Y. M. S.; GODWIN, I. D.; ADKINS, S. W. An improved protocol for somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.). **Acta Horticulturae**, v. 461, p. 467-476, 1998.

SANDOVAL-CANCINO, G.; SAÉNZ, L.; CHAN, J. L.; OROPEZA, C. Improved formation of embryogenic callus from coconut immature inflorescence explants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 52, n. 4, p. 367-378, 2016.

SANÉ, D.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; GASSAMA-DIA, Y. K.; SAGNA, M.; TROUSLOT, M. F.; DUVAL, Y.; BORGEL, A. Histocytological analysis of

callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). **Annals of Botany**, v. 98, p. 301-308, 2006.

SANTANEN, A.; SIMOLA, L. K. Changes in polyamine metabolism during somatic embryogenesis in *Picea abies*. **Journal of Plant Physiology**, v. 140, p. 475-480, 1992.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; DA GUEDES, R. S.; FERMINO JR., P. C. P.; SILVA, T. L.; COSTA, F. H. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 46, p. 378-385, 2010.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; GUEDES, R. S.; DA 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.

SCHNABLOVÁ, R.; SYNKOVÁ, H.; VIČÁNKOVÁ, A.; BURKETOVÁ, L.; EDER, J.; CVIKROVÁ, M. Transgenic *ipt* tobacco overproducing cytokinins overaccumulates phenolic compounds during in vitro growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, p. 526-534, 2006.

SCHUMANN, G.; RYSCHKA, U.; SCHULZE, J.; KLOCKEL, E. Anatomy of Somatic Embryogenesis. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry: Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed**. Berlin: Springer – Verlag, 1995. p. 71-86.

SCHWENDIMAN, J.; PANNETIER, C.; N. MICHAUX-FERRIERE. Histology of Somatic Embryogenesis from Leaf Explants of the Oil Palm *Elaeis guineensis*. **Annals of Botany**, v. 62, n. 1, p.43-52, 1988.

SGHAIER, B.; BAHLOUL, M.; GARGOURI BOUZID, R.; DRIRA, N. Development of zygotic and somatic embryos of *Phoenix dactylifera* L. cv. Deglet Nour: comparative study. **Scientia Horticulturae**, v. 116, p. 169-175, 2008.

SHARMA, S. K.; MILLAM, S. Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L.: a histological examination of key developmental stages. **Plant Cell Report**, v. 23, p. 115-119, 2004.

SHOEMAKER, R. C.; CHRISTOFFERSON, S. E.; GALBRAITH, D. W. Storage protein accumulation patterns in somatic embryos of cotton (*Gossypium hirsutum* L.), **Plant Cell Reports**, v. 6, p. 12-15, 1987.

SILVA, A. T.; NHUT, D. T. Cells: functional units of TCLs. In: NHUT, D. T.; LE, B. V.; TRAN THANH VAN, K.; THORPE, T. (Ed.). **Thin Cell Layer Culture System: Regeneration and Transformation Applications**. Dordrecht: Springer, 2003. p. 65-134.

SILVA, J. A. T. Plant thin cell layers: Challenging the concept. **International Journal of Plant Developmental Biology**, v. 2, n. 1, p. 79-81, 2008.

SILVA, J. A. T.; DOBRÁNSZKI, J. The plant growth correction factor. I. The hypothetical and philosophical basis. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 5, p. 73-74, 2011.

SILVA, J. A. T.; DOBRÁNSZKI, J. Dissecting the concept of the thin cell layer: theoretical basis and practical application of the Plant Growth Correction Factor. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 33, p. 881-895, 2014.

SILVA, J. A. T.; DOBRÁNSZKI, J. Plant thin cell layers: update and perspectives. **Folia Horticulturae**, v. 27, n. 2, p. 183-190, 2015.

SILVA, J. A. T.; TRAN THANH VAN, K.; BIONDI, S.; NHUT, D. T.; ALTAMURA, M. M. Thin cell layers: Developmental building blocks in ornamental biotechnology. **Floriculture and Ornamental Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 1-13, 2007.

SMITH, D. L.; KRIKORIAN, A. D. Release of somatic embryogenic potential from excised zygotic embryos of carrot and maintenance of proembryonic cultures in hormone-free medium. **American Journal of Botany**, v. 76, p. 1832-1843, 1989.

STEIN, V. C.; PAIVA, R.; VARGAS, D. P.; SOARES, O. S.; ALVES, E.; NOGUEIRA, G. F. Ultrastructural calli analysis of *Inga vera* Willd subsp. *Affinis* (DC.) T.D. Penn. **Revista Árvore**, v.34, n 5, p. 789-796, 2010.

STEINMACHER, D. A.; GUERRA, M. P.; SAARE-SURMINSKI, K.; LIEBEREI, R. A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, v. 108, n. 8, p. 1463-1475, 2011.

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, morphohistological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation. **Annals of Botany**, v. 100, p. 699-709, 2007.

STEWART, F. C. Vistas in plant physiology: problems of organization, growth, and morphogenesis. **Canadian Journal of Botany**, v. 39, p. 441-460, 1961.

TAKEDA, T.; HAYAKAWA, F.; OE, K.; MATSUOKA, H. Effects of exogenous polyamines on embryogenic carrot cells. **Biochemical Engineering Journal**, v. 12, p. 21-28, 2002.

TAN, Y.; HU, W.; XU, X.; ZHOU, J.; WANG, C.; LIU, X.; CHENG, G. Polyamine plays a role in subculture growth of *in vitro* callus of indica rice. **Acta Biologica Cracoviensia**, v. 59, n. 1, 2017.

TAO, L.; YANG, Y.; WANG, Q.; YOU, X. Callose deposition is required for somatic embryogenesis in plasmolyzed *Eleutherococcus senticosus* zygotic embryos. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 14115-14126, 2012.

THOMAS, E.; KONAR, R. N.; STREET, H. E. The fine structure of the embryogenic callus of *Ranunculus sceleratus* L. **Journal of Cell Science**, v. 2, p. 95-109, 1972.

TRAN THANH VAN, M. Direct flower new formation from superficial tissues of small explant of *Nicotiana tabacum* L. **Planta**, v. 115, p. 87-92, 1973b.

TRAN THANH VAN, M. *In vitro* control of *de novo* flower, bud, root and callus differentiation from excised epidermal tissues. **Nature**, v. 246, p. 44-45, 1973a.

TRAN THANH VAN, M. Thin cell layer concept. In: TAN NHUT, D; VAN LE, B.; TRAN THANH VAN, K.; THORPE, T. (Eds). **Thin Cell Layer Culture System: Regeneration and Transformation Applications**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 1-16.

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

VERDEIL, J. L.; HOCHER, V.; HUET, C.; GROSDÉMANGE, F.; ESCOUTE, J.; FERRIERE, N.; NICOLE, M. Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence. **Annals of Botany**, v. 88, p. 9-18, 2001.
VERDUS, M.-C.; DUBOIS, T.; DUBOIS, J.; VASSEUR, J. Ultrastructural changes in leaves of *Cichorium* during somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, v. 72, p. 375-383, 1993.

VIDAL, B. C. Dichroism in collagen bundles stained with xyloidine-Ponceau 2R. **Annales d'Histochimie**, v. 15, p. 289-296, 1970.

VOLPERT, R.; OSSWALD, W.; ELSTNER, E. F. Effects of cinnamic acid derivatives on indole acetic acid oxidation by peroxidase. **Phytochemistry**, v. 38, n. 1, p. 19-22, 1995.

VONDRÁKOVÁ, Z.; ELIÁSOVÁ, K.; VÁGNER, M.; MARTINCOVÁ, O.; CVIKROVÁ, M. Exogenous putrescine affects endogenous polyamine levels and the development of *Picea abies* somatic embryos. **Plant Growth Regulation**, v. 75, p. 405-414, 2015.

WANG, H. C.; CHEN, J. T.; CHANG, W. C. Morphogenetic routes of long-term embryogenic callus culture of *Areca catechu*. **Biologia Plantarum**, v. 54, p. 1-5, 2010.

WEST, M. A.; HARADA, J. Embryogenesis in higher plants: an overview. **The Plant Cell**, v. 5, p. 1361-1369, 1993.

WINKELMANN, T. Somatic versus zygotic embryogenesis: learning from seeds. In: GERMANÀ, M. A.; LAMBARDI, M. (Eds.). **In vitro embryogenesis in higher plants - Methods in molecular biology**. New York: Springer, 2016. p. 25-46.

WU, X.-B.; WANG, J.; LIU, J.-H.; DENG, X.-X. Involvement of polyamine biosynthesis in somatic embryogenesis of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis*) induced by glycerol. **Journal of Plant Physiology**, n. 166, p. 52-62, 2009.

YADAV, J. S.; RAJAM, M. V. Spatial distribution of free and conjugated polyamines in leaves of *Solanum melongena* L. associated with differential morphogenetic capacity:

efficient somatic embryogenesis with putrescine. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, n. 313, p. 1537-1545, 1997.

YEUNG, E. C. **Structural and development patterns in somatic embryogenesis**. In: THORPE, T. A. (Ed.). *In vitro* Embryogenesis in Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1995, p. 205-248.

YOU, X. L.; YI, J. S.; CHOI, Y. E. Cellular change and callose accumulation in zygotic embryos of *Eleutherococcus senticosus* caused by plasmolyzing pretreatment result in high frequency of single-cell-derived somatic embryogenesis. **Protoplasma**, v. 227, p. 105-112, 2006.

ZAVALIEV, R.; UEKI, S.; EPEL, B. L.; CITOVSKEY, V. Biology of callose (β -1,3-glucan) turnover at plasmodesmata. **Protoplasma**, v. 248, p. 117-130, 2011.

ZHAO, P.; BEGCY, K.; DRESSELHAUS, T.; SUN, M.-X. Does early embryogenesis in eudicots and monocots involve the same mechanism and molecular players. **Plant Physiology**, v. 173, p. 130-142, 2017.

ZHOU, T.; YANG, X.; GUO, K.; DENG, J.; XU, J.; GAO, W.; LINDSEY, K.; ZHANG, X. ROS homeostasis regulates somatic embryogenesis via the regulation of auxin signaling in cotton. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 15, p. 2108-2124, 2016.

CAPÍTULO IV

FATORES ENVOLVIDOS NA INDUÇÃO DE CALOS PARA A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE GUEROBA [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] A PARTIR DE TECIDOS FOLIARES

FATORES ENVOLVIDOS NA INDUÇÃO DE CALOS PARA A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE GUEROBA [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] A PARTIR DE TECIDOS FOLIARES

RESUMO

Neste estudo, buscou-se determinar os fatores envolvidos na aquisição da competência para formação de calos a partir de folhas imaturas de uma planta jovem (4 anos de idade) e uma planta adulta (cerca de 10 anos de idade) de gueroaba [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.], bem como analisar os eventos anatômicos e histoquímicos subjacentes ao processo, visando subsidiar a embriogênese somática. Avaliou-se o efeito de auxinas e concentrações, tipos de meios de cultura, regiões do palmito e posição dos explantes na formação de calos. Para tal, foram testados os efeitos das auxinas ácido 4-amino-3, 5, 6-tricloropicolínico (Picloram) ou ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), em diferentes concentrações (0, 225, 450, 675 e 900 μM), em explantes provenientes de uma planta jovem de gueroaba. Já em explantes oriundos de uma planta adulta, avaliaram-se os efeitos dos meios de cultura de MS e Y3, das regiões proximal, mediana e distal do palmito e das posições horizontal e vertical de tecidos foliares. A formação de calos primários, segundo as análises estatísticas, foi significativamente influenciada pela fonte de auxina e concentração utilizadas, com destaque para o Picloram que proporcionou um volume satisfatório de calos iniciais, com diferentes características morfológicas, embora anatomicamente semelhantes (todos os calos observados exibem uma zona central, composta por células com características meristemáticas, envolvida por uma zona periférica, contendo células com características parenquimáticas). A origem dos calos, de modo geral, foi relacionada aos tecidos vasculares. A percentagem de calos considerados embriogênicos, provenientes de tecidos de uma planta jovem, foi obtida aos 570 dias de cultivo e foram caracterizados pelo predomínio de proembriões distribuídos, sobretudo, na região periférica dos calos iniciais e com nítido espessamento da parede celular por deposição de calose, embora não se tenha verificado a formação de embriões somáticos a partir desses. O experimento com palmito proveniente de planta adulta revelou que a formulação de Y3 e a posição horizontal, de modo geral, foram mais eficientes na produção de calos, independente da qualidade dos calos. Além do mais, explantes foliares oriundos da região distal do palmito, de modo geral, exibiram um bom desempenho na produção de calos, devido, provavelmente, ao maior grau de diferenciação dos seus tecidos vasculares, o que, presumivelmente, proporciona maior eficiência no transporte de auxinas (endógena e exógena). A otimização dos fatores supracitados envolvidos com a formação de calos realizada nesse estudo pode possibilitar o suprimento de material (calos) para a realização de estudos futuros mais detalhados (manipulação de diferentes sinais externos e/ou celulares) para a expressão do programa embriogênico a partir de tecidos foliares jovens de gueroaba.

Palavras-chaves: Palmeira; palmito; auxinas; calogênese; tecidos vasculares.

FACTORS INVOLVED IN THE CALLI INDUCTION FOR SOMATIC EMBRYOGENESIS OF GUEROBA [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] FROM LEAF TISSUES

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the factors involved during acquisition of competence to callus formation from immature leaves of young (4 years) and adults (10 years) plants of guerocha [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.], as well as to analyze the anatomical and histochemical events underlying the process, aiming to subsidize somatic embryogenesis. The effect of auxins and concentrations, types of culture medium, palm heart regions and position of explants on callus formation were evaluated. For this, the effects of 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid (Picloram) or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) were tested in different concentrations (0, 225, 450, 675 and 900 μM) in explants from young plants of guerocha. On explants from adult plants, the effects of MS and Y3 culture media, the proximal, medial and distal regions of the palm heart, and the horizontal and vertical positions of leaf tissues were evaluated. The primary calli formation, according to the statistical analyzes, was significantly influenced by the source of auxin and concentration used, especially Picloram, which provided a satisfactory volume of initial callus, with different morphological characteristics, although anatomically similar (all calli observed presented a central zone, composed of cells with meristematic characteristics, surrounded by a peripheral zone, containing cells with parenchymatic characteristics). Calli origin was generally related to vascular tissues. The percentage of embryogenic calli considered from tissues of young plants was obtained at 570 days culture and was characterized by the predominance of proembryos distributed mainly in the peripheral region of the initial callus and with a clear thickening of the cell wall by callose deposition, although the formation of somatic embryos from them have not been verified. The experiment with palm heart from adult plants revealed that the Y3 formulation and the horizontal position, in general, were more efficient in calli production, regardless of callus quality. Moreover, leaf explants from the distal region of the palm heart are certainly more competent for callus production than those from other regions, due to the greater degree of differentiation of their vascular tissues, which presumably provides greater efficiency in the auxins transport (endogenous and exogenous). The optimization of the aforementioned factors involved in the calli formation in this study may allow the supply of material (calli) to carry out more detailed future studies (manipulation of different external and/or cellular signals) to allow the expression of the embryogenic program from young leaf tissues in guerocha.

Keywords: Palm tree; palm heart; auxins; callogenesis; vascular tissues

FATORES ENVOLVIDOS NA INDUÇÃO DE CALOS PARA A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE TECIDOS FOLIARES DE PLANTAS DE GUEROBA [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]

1. INTRODUÇÃO

Gueroba [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] é uma palmeira nativa do Brasil, com grande, porém subexplorado potencial econômico. A espécie produz palmito de sabor amargo característico, muito apreciado regionalmente, que se diferencia de forma considerável daqueles palmitos comumente consumidos a nível nacional e mundial, produzidos pelos gêneros *Euterpe* (Açaizeiro e Juçara) e *Bactris* (Pupunheira) (HIANE *et al.*, 2011). Todavia, os plantios comerciais de gueroba se limitam às fronteiras centrais do país.

A expansão da cultura e a exploração comercial sustentável da espécie depende do desenvolvimento de tecnologias que incluam a seleção e a propagação de genótipos com características de interesse. Contudo, a propagação de gueroba é realizada exclusivamente via sementes, que apresenta os inconvenientes da baixa e lenta germinabilidade, além da desuniformidade das plantas resultantes (DINIZ; SÁ, 1995; DIAS, 2012). Além do mais, por não perfilhar e por não apresentar crescimento secundário, técnicas convencionais de propagação vegetativa não se aplicam à gueroba.

Nesse sentido, a embriogênese somática surge como uma das técnicas mais indicadas para a propagação clonal dessa palmeira. Essa técnica reflete o potencial de desenvolvimento único das células somáticas dos vegetais (SZYRAJEW *et al.*, 2017), que resulta, mediante condições apropriadas *in vitro*, na transição de células somáticas diferenciadas em estruturas bipolares semelhantes a embriões zigóticos, sem que ocorra fusão de gametas (WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986). Essas estruturas são capazes de regenerar plantas geneticamente iguais as células somáticas iniciais.

Uma das características mais marcantes da embriogênese somática consiste na variedade de fatores físicos e químicos indutores do processo, com destaque para os reguladores de crescimento, notadamente, auxinas e citocininas (níveis celulares internos e/ou externos) e/ou variados tratamentos de estresse (FEHÉR, 2006; KARAMI; SAID, 2010; ZAVATTIERI *et al.*, 2010; FEHÉR, 2015; NIC-CAN *et al.*, 2016). Dentre as auxinas, além do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), também têm sido relatados em palmeiras bons resultados na indução da embriogênese somática proporcionados

pela auxina ácido 4-amino-3, 5, 6-tricloropicolínico (Picloram) em espécies como *B. gasipaes* (VALVERDE; ARIAS; THORPE, 1987; STEINMACHER; CLEMENT; GUERRA, 2007; STEINMACHER *et al.*, 2007a, b), *Calamus merrillii* e *C. subinermis* (GOH *et al.*, 1999; GOH *et al.*, 2001) e *Euterpe oleracea* (SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2012).

Dentre os explantes passíveis de serem usados na iniciação da técnica, os tecidos foliares de plantas adultas exibem algumas vantagens, como baixa taxa de contaminação (CORRÊA *et al.*, 2016); abundância de tecido; quando a retirada das folhas é realizada sem atingir o meristema apical permite a sobrevivência da planta mãe (REE; GUERRA, 2015; CORRÊA *et al.*, 2016) e, dependendo da origem genética da palmeira, uma porcentagem significativa de explantes produzem calos (DUVAL *et al.*, 1995). Além do mais, possibilita a clonagem de indivíduos fenotipados em campo, sem a influência da segregação do material genético pós fecundação cruzada.

Vários autores mencionaram o uso de explantes foliares de plantas adultas visando a propagação clonal de diferentes espécies de palmeiras, como *B. gasipaes* (ALMEIDA; ALMEIDA, 2006), *Cocos nucifera* (PANNETIER; BUFFARD-MOREL, 1982; BUFFARD-MOREL; VERDEIL; PANNETIER, 1992) e *Elaeis guineensis* (AHÉE *et al.*, 1981; SCHWENDIMAN; PANNETIER; MICHAUX-FERRIERE, 1988; CONSTANTIN *et al.*, 2015; WIENDI; CONSTANTIN; WACHYAR, 2015). *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc., contudo, não apresenta relatos na literatura do uso de tecidos somáticos obtidos de plantas adultas como explantes para o cultivo *in vitro*.

No cultivo *in vitro* de palmeiras, a produção de calos, considerada por Fehér (2015) manifestação do estado celular de desdiferenciação, se porta, dependendo da espécie e estágio de desenvolvimento do explante, como um pré-requisito necessário à transição de células somáticas para embriogênicas e consequente regeneração de plantas (DUVAL *et al.*, 1995; CHAN *et al.*, 1998; GOH *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2003; PÉREZ-NÚÑEZ *et al.*, 2006; MOURA *et al.*, 2008; BALZON; LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2013; LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2014; JAYANTHI *et al.*, 2015; SANDOVAL-CANCINO *et al.*, 2016). Todavia, a formação de calo, dependendo da espécie, é genótipo-dependente, o que restringe a multiplicação vegetativa de variedades de interesse (GUEYE *et al.*, 2009a). Nesse sentido, a compreensão da calogênese em gueroa subsidiará o desenvolvimento de técnicas de micropropagação aplicáveis para genótipos de interesse, inclusive de outras palmeiras. Além do mais, a elucidação da dinâmica celular envolvida na formação de calos é de

fundamental importância para elucidação da totipotência celular, assim como dos mecanismos relacionados à embriogênese somática (WANG *et al.*, 2011). Vale mencionar, que até a presente data, não há literatura referente à embriogênese somática de palmeiras do gênero *Syagrus*.

Dentro dessa conjuntura, este trabalho teve como objetivo determinar fatores envolvidos na aquisição da competência para formação de calos a partir de folhas imaturas de plantas (jovem e adulta) de gueroba [*S. oleracea* (Mart.) Becc.], bem como investigar os aspectos anatômicos e histoquímicos subjacentes ao processo, visando subsidiar a embriogênese somática futura.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), situado em Brasília-DF.

2.1 Material vegetal e condições de cultivo – indução de calos

Para realização dos experimentos, foram utilizadas folhas jovens aclorofiladas e ainda não expandidas (palmitos) de gueroba (*Syagrus oleracea*), provenientes de plantas (joven = 4 anos de idade – experimento 2.1.1 e adulta = cerca de 10 anos – experimento 2.1.2) previamente selecionadas de duas populações localizadas no município de Itaberaí, Goiás, Brasil (Coordenadas: 16°08'175" S e 49°42'344" W – experimento 2.1.1 e 16°4'28.12" S e 49°43'18.08" O – experimento 2.1.2) (Anexo 1). Após coletado em campo, o material vegetal foi conduzido ao laboratório, onde as folhas mais externas e bainhas remanescentes de folhas senescidas foram removidas, se mantendo apenas o cilindro de folhas aclorofiladas não expandidas. Em seguida, o comprimento dos palmitos foi reduzido para aproximadamente 30 cm.

Logo após, os palmitos, formados exclusivamente por folhas internas e aclorofiladas, foram desinfestados em câmara de fluxo laminar mediante imersão em álcool etílico 70% (v/v) por três minutos, seguida por imersão em hipoclorito de sódio (NaOCl) (2,5% de cloro ativo) por 20 minutos e, posterior, tríplice lavagem em água destilada e autoclavada por um minuto cada. Uma vez realizada a desinfestação, com o auxílio de pinças e bisturis e em câmara de fluxo laminar, as folhas foram excisadas em explantes de aproximadamente 1,0 cm², padronizando-se quatro lâminas de folíolos/explante.

Todos os meios usados nas diferentes fases do processo embriogênico foram gelificados com 2,5 g.L⁻¹ de *Phytigel* (Sigma, St. Louis, MO) e o pH ajustado para 5,8 ± 0,1 antes da adição do agente gelificante. Os meios foram autoclavados por 20 minutos à 121 °C e 1,5 atm de pressão. Todos os cultivos foram realizados em placas de *Petri* (15 x 90 mm), seladas com filme policloreto de polivinila (PVC) transparente, contendo aproximadamente 25 mL de meio de cultura por placa, que foram mantidas no escuro em sala de crescimento à 25 ± 2 °C.



Figura 1. Coleta de palmitos de gueroaba [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] em campo. A: Planta jovem doadora do palmito com 4 anos de idade. B: Extremidade inferior da planta mencionada na letra A, com palmito no seu interior. C: Corte da planta doadora do palmito com cerca de 10 anos de idade. D, E: Extremidade superior do estipe da planta mencionada na letra C, com palmito no seu interior.

2.1.1 Influência de diferentes auxinas e concentrações na indução de calos

Para a indução de calos, as folhas foram inoculadas em meio de cultura Y3 (EEUWENS, 1976). A fonte de Fe-EDTA e vitaminas foi mantida de acordo com a concentração original de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). As auxinas ácido 4-amino-3, 5, 6-tricloropicolínico (Picloram) ou ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) foram acrescentadas em cinco concentrações cada: 0 (controle), 225, 450, 675 e 900 μM . Todos os meios foram suplementados com 30 g.L^{-1} de sacarose, 0,5 g.L^{-1} de glutamina e 2,5 g.L^{-1} de carvão ativado.

Os subcultivos foram realizados a cada 30 dias e a porcentagem de explantes oxidados e de explantes com formação de calo primário (sem considerar a quantidade e a qualidade do calo) foram determinadas aos 180 dias. Os explantes avaliados como oxidados foram aqueles que apresentaram todo o tecido foliar escurecido. A porcentagem de explantes oxidados foi obtida através da razão entre a quantidade de explantes oxidados e o número total de explantes por placa, multiplicada por 100. A porcentagem de explantes com calo foi calculada da mesma forma supracitada.

2.1.2 Influência do meio de cultura, das regiões do palmito e da posição dos explantes na indução de calos

Neste experimento foi avaliada a influência na indução de calos das formulações salinas do meio de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e Y3 (EEUWENS, 1976), das regiões do palmito utilizadas para obtenção dos explantes (Figura 2A) e da posição dos explantes no meio de cultura (Figura 2B).

Para tanto, o palmito foi dividido em três partes com tamanhos iguais (cerca de 10 cm cada), de onde foram obtidos os explantes a serem inoculados nos dois meios de indução de calos supracitados. As regiões foram: proximal (região mais próxima do meristema), mediana (região intermediária) e distal (região mais próxima do ápice foliar) (Figura 2A).

No meio Y3, a fonte de Fe-EDTA e vitaminas foi mantida de acordo com a concentração original de MS. Adicionalmente, os meios foram suplementados com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado e 450 µM de Picloram (resultado do experimento anterior – ver seção 3.1). Foi testada, ainda, para cada região do palmito e formulação salina, a posição dos explantes no meio de indução, a saber: horizontal (porção adaxial em contato com o meio) e vertical (Figura 2B).

Os subcultivos foram realizados a cada 30 dias e a porcentagem de explantes oxidados e a porcentagem de explantes com formação de calo primário (sem considerar a quantidade e a qualidade do calo) foram determinadas aos 150 dias. Os explantes avaliados como oxidados foram aqueles que apresentaram todo o tecido foliar escurecido.

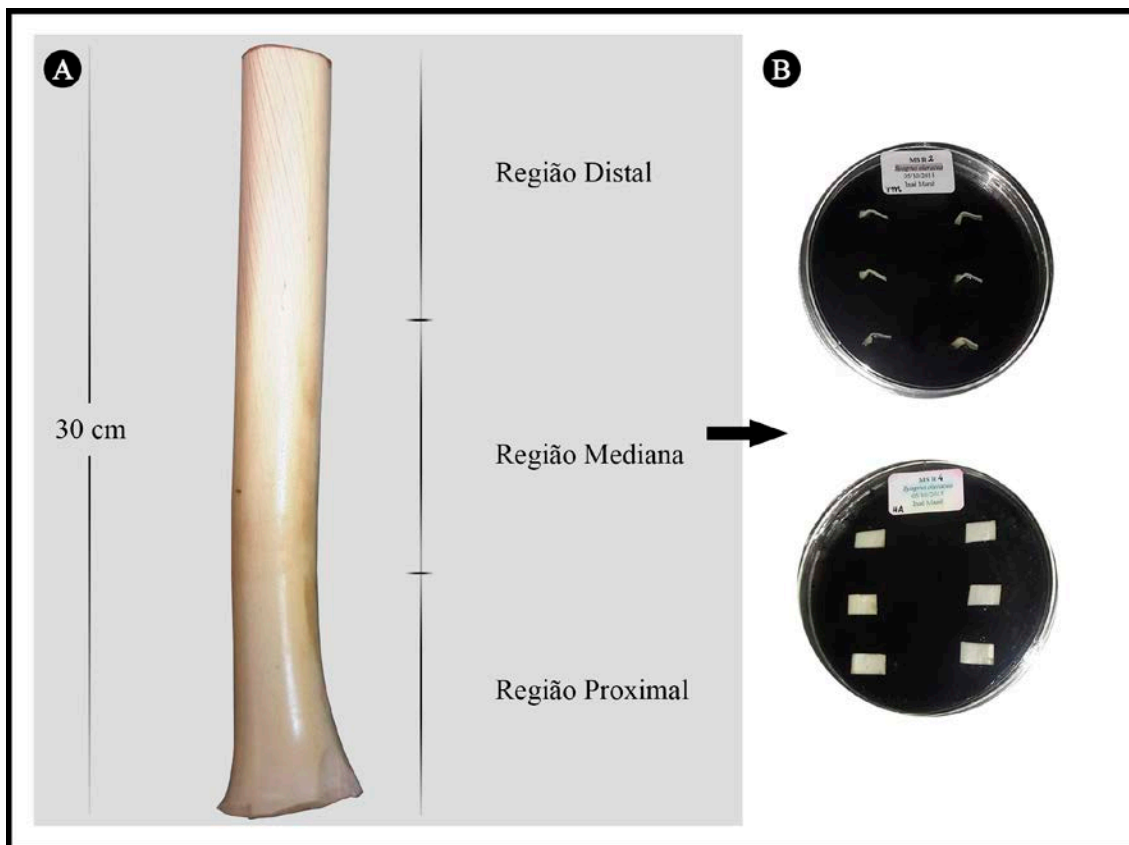


Figura 6. Palmito de gueroba [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] utilizado para inoculação *in vitro*. A: Regiões a partir das quais foram excisados os explantes. B: Explantes inoculados em meio de cultura (posição vertical e horizontal).

2.2 Multiplicação de calos iniciais

Visando a proliferação da massa calogênica obtida na fase de indução do experimento 2.1.1, os calos foram isolados e transferidos para o mesmo meio básico original, no entanto, suplementado com 450 μM de Picloram e 450 μM de 2,4-D. Os explantes foram mantidos nas mesmas condições ambientais utilizadas para a fase anterior, onde permaneceram por 120 dias.

2.3 Diferenciação de embriões somáticos

Os calos oriundos do experimento 2.1.1, após 120 dias em meio de multiplicação, foram transferidos para novo meio de cultura, segundo metodologia descrita por Balzon, Luis e Scherwinski-Pereira (2013). O meio basal foi acrescido com 0,5 g.L^{-1} de cisteína, 0,5 g.L^{-1} de caseína hidrolisada, 0,54 μM de ácido naftalenoacético (ANA) e 2-isopenteniladenina (2-iP), nas concentrações 0; 12,30 e 24,60 μM . O 2-iP foi inserido no meio de cultura após filtragem (filtro de 0,22 μm Millipore®), após a

autoclavagem do meio de cultura. Os subcultivos foram realizados a cada 90 dias e a percentagem de calos embriogênicos (com proembriões) foi determinada aos 270 dias no meio supracitado. Em seguida, os explantes foram transferidos para novo meio de cultivo, caracterizado pelo meio basal Y3 com os componentes básicos originais já mencionados, contudo, desprovido de reguladores de crescimento e com 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, onde permaneceram por 90 dias.

Tabela 1. Composição dos meios de cultura e períodos de tempo (dias) usados no processo de embriogênese somática em gueroba (*Syagrus oleracea*), a partir de tecidos foliares de uma planta jovem (4 anos) sob efeito de diferentes auxinas e concentrações na indução de calos (experimento 2.1.1)

Componentes	Indução de calos	Multiplicação de calos iniciais	Diferenciação de embriões somáticos	
Meio de cultura	Y3	Y3	Y3	Y3
Vitaminas	MS	MS	MS	MS
Glutamina (g.L ⁻¹)	0,5	0,5	0,5	0,5
Cisteína (g.L ⁻¹)	-	-	0,5	0,5
Caseína hidrolisada (g.L ⁻¹)	-	-	0,5	0,5
Picloram (µM)	0, 225, 450, 675 e 900	450	-	-
2,4 D (µM)	0, 225, 450, 675 e 900	450	-	-
ANA (µM)	-	-	0,54	-
2-iP (µM)	-	-	0; 12,30 e 24,60	-
Sacarose (g.L ⁻¹)	30	30	30	30
<i>Phytigel</i> (g.L ⁻¹)	2,5	2,5	2,5	2,5
Carvão vegetal (g.L ⁻¹)	2,5	2,5	-	-
Períodos (dias)	210	120	270	90

Já os calos obtidos na fase de indução, provenientes do experimento 2.1.2, foram transferidos para meio basal Y3 (melhor resultado obtido na fase de indução - ver seção 3.2), com os mesmos componentes básicos originais, no entanto, suplementado com Picloram nas concentrações 20, 40 e 60 µM e desprovido de carvão ativado, com subcultivos realizados a cada 90 dias.

Tabela 2. Composição dos meios de culturas e períodos de tempo (dias) usados no processo de indução de calos visando à embriogênese somática em gueroba (*Syagrus oleracea*) a partir de tecidos foliares de uma plantas adulta (cerca de 10 anos), sob efeito de diferentes meios de cultura, das regiões do palmito e da posição dos explantes na indução de calos (experimento 2.1.2)

Componentes	Indução de calos	Diferenciação de embriões somáticos
Meio de cultura	Y3, MS	Y3
Vitaminas	MS	MS
Glutamina (g.L ⁻¹)	0,5	0,5
Cisteína (g.L ⁻¹)	-	-
Caseína hidrolisada (g.L ⁻¹)	-	-
Picloram (µM)	450	20, 40, 60
2,4 D (µM)	450	20, 40, 60
Sacarose (g.L ⁻¹)	30	30
Phytigel (g L ⁻¹)	2,5	2,5
Carvão vegetal (g L ⁻¹)	2,5	-
Períodos (dias)	150	90

2.4 Análises anatômica e histoquímica

Para a análise anatômica, foram coletadas amostras de explantes que não foram submetidos aos tratamentos e de diferentes formações calogênicas. As etapas de fixação, desidratação e emblocamento do material vegetal coletado 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 M (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 M, pH 7,2), por um período de 1 hora cada (sob vácuo); logo após, desidratação em série alcoólica crescente (30%, 50%, 70% - 100%, 100%), por uma hora cada (sob vácuo) e infiltração em historesina (Leica, Heidelberg, Alemanha), segundo as especificações do fabricante.

Posteriormente, cortes longitudinais e transversais (3-7 µm) foram obtidos em micrótomo rotativo manual (Leica®, RM212RT), distendidos e aderidos às lâminas microscópicas em placa aquecida à 40 °C. As secções obtidas foram coradas com Azul de Toluidina (0,5%) para caracterização estrutural e identificação de compostos fenólicos (O'BRIEN; FEDER; MCCYLLY, 1964).

As secções obtidas a partir do material embocado foram submetidas aos seguintes testes histoquímicos: *Periodic Acid Schiff* – PAS (O'BRIEN; MCCULLY, 1981) usado para identificar polissacarídeos neutros; Lugol (JOHANSEN, 1940) para detecção de grãos de amido; *Xylidine Ponceau* – XP utilizado para identificação de proteínas (VIDAL, 1970) e Azul de Anilina para detecção de calose, sob excitação com luz ultravioleta (CURRIER, 1957; ESCHRICH; CURRIER, 1964), com auxílio de filtro UV de 340-380 nm. A obtenção e análise de imagens foram realizadas via microscópio Leica DM 750 e programa Leica Application Suite EZ.

Para a Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET), as amostras foram fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2) e mantidas à 4° C por cerca de 24 horas. Logo após, foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio 2% em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2). Para pós-fixação, essas amostras foram imersas em acetato de uranila 0,5% (contratação *in bloc*) durante 24 horas à 4°C e desidratadas em série crescente de etanol (10 a 100%). Seguiu-se a infiltração com resina Epon 812 ©, conforme protocolo do fabricante. A inclusão foi feita em moldes próprios para polimerização à 70°C. Secções ultrafinas (60 nm) foram obtidas utilizando ultramicrotomo Leica, as quais foram contrastadas com acetato de uranila 5% por 1 hora em condições escuras. As amostras foram analisadas e fotodocumentadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET - Zeiss modelo EM 109).

2.5 Análises estatísticas

Os experimentos foram montados em delineamento estatístico inteiramente casualizado. Os dados obtidos com o uso de auxinas e concentrações foram avaliados segundo esquema fatorial 2 x 5: duas auxinas (Picloram e 2,4-D), em cinco diferentes concentrações cada (0, 225, 450, 675 e 900 µM), totalizando 10 tratamentos. Cada tratamento foi composto por 10 repetições, com seis explantes cada. Na fase de diferenciação, cada calo embriogênico foi considerado uma repetição.

Para o efeito dos meios de cultura, região do palmito e posição do explante, os dados foram avaliados em esquema fatorial 2 x 3 x 2: dois meios de cultura (MS e Y3), três regiões do palmito (proximal, mediana e distal) e duas posições do explante no meio de indução (horizontal e vertical), totalizando 12 tratamentos. Cada tratamento foi composto por oito repetições, com seis explantes cada.

O conjunto de dados obtido foi submetido à análise de variância (ANOVA) pelo teste F e, quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de significância, por meio do software estatístico R (R CORE TEAM, 2015).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Influência de diferentes auxinas e concentrações

3.1.1 Indução de calos

Após sete dias em meio de cultura, os explantes exibiram as primeiras alterações caracterizadas pela modificação da textura foliar de maleável para mais consistente ou quebradiça (Figura 4B) e intumescimento das folhas, que refletiu no aumento do tamanho do explante. A oxidação foi discreta ou quase nula e quando observada ocorreu nas bordas seccionadas (Figura 4C) e folhas superiores dos explantes.

Formações calogênicas incipientes, translúcidas e sem formato específico, foram observadas já no primeiro mês de cultivo (Figura 4D, 7A). Após 120 dias em meio de indução, os calos se tornaram mais visíveis e sua formação não obedeceu a um padrão de origem nos explantes, mas comumente foram visualizados nas bordas seccionadas (Figura 4E), ratificando uma resposta clássica de desdiferenciação e reprogramação sobre a superfície ferida (WANG *et al.*, 2011), e na nervura central das folhas (Figura 4F), semelhante ao mencionado por Wang *et al.* (2011) em *Medicago truncatula*. Em menor frequência, calos alongados, com coloração amarela e consistência compacta também foram observados a partir da nervura central das folhas (Figura 8).

Avaliação do percentual de oxidação e de calos primários formados (Figura 3) foi realizada aos 180 dias de cultivo. A análise da taxa de oxidação, que considerou como oxidados aqueles explantes que apresentaram todo o tecido foliar escurecido, não revelou diferenças estatísticas entre os tratamentos testados, com um valor médio de 75,7% de oxidação para explantes sob efeito de Picloram e de 77,3% para explantes sob efeito de 2,4-D. Salienta-se que a oxidação, embora relativamente alta não pareceu afetar negativamente a formação de calos primários.

Desde longa data, se conhece os efeitos depreciativos do processo de oxidação de compostos fenólicos liberados via excisão de tecidos inoculados *in vitro*, que pode ocasionar o escurecimento dos explantes e do meio de cultivo (BHAT; CHANDEL, 1991; JONES; SAXENA, 2013) e inibir o crescimento celular (NAZ; ALI; IQBAL, 2008; AHMAD *et al.*, 2013). Além do ferimento do explante, que promove o rompimento dos compartimentos celulares e mistura dos seus conteúdos e consequente pronta exposição dos compostos fenólicos ao ar e às diferentes enzimas que participam do processo oxidativo (LAUKKANEN *et al.*, 1999), reguladores de crescimento em

altas concentrações podem promover a produção de compostos fenólicos (NORTH; NDAKIDEMI; LAUBSCHER, 2012), como o mencionado por Karun *et al.* (2004) durante o cultivo *in vitro* de *Areca catechu*. O acúmulo desses compostos e dos seus produtos de oxidação modificam o meio de cultivo e a absorção de metabólitos (ANDRADE *et al.*, 2000). No entanto, se ressalta que nem sempre o escurecimento do explante, consequente do processo oxidativo, é correlacionado negativamente com o cultivo *in vitro*, como o mencionado por Neuenschwander e Baumann (1992) e Yang *et al.* (2013) durante a embriogênese somática de *Coffea arabica* e *Fraxinus mandshurica*, respectivamente, o que corrobora com o observado aqui.

A formação de calos primários, por outro lado, segundo as análises estatísticas foi significativamente influenciada pela fonte de auxina e concentração utilizadas. O desdobramento da interação (auxinas dentro de cada concentração) revelou que os tratamentos sob efeito de Picloram – 225 e 450 μM – proporcionaram maior percentagem de calos primários que aqueles sob efeito de 2,4-D nas mesmas concentrações (Figura 3). Já o desdobramento das concentrações dentro de cada auxina não revelou diferenças estatísticas entre as concentrações de Picloram avaliadas (exceto em comparação ao controle), embora o tratamento 450 μM tenha se destacado com uma taxa de 70% de produção de calos. Em meio suplementado com 2,4-D, as concentrações 450, 675 e 900 μM foram igualmente eficientes e superiores a 225 μM (8,33%) (Figura 3).

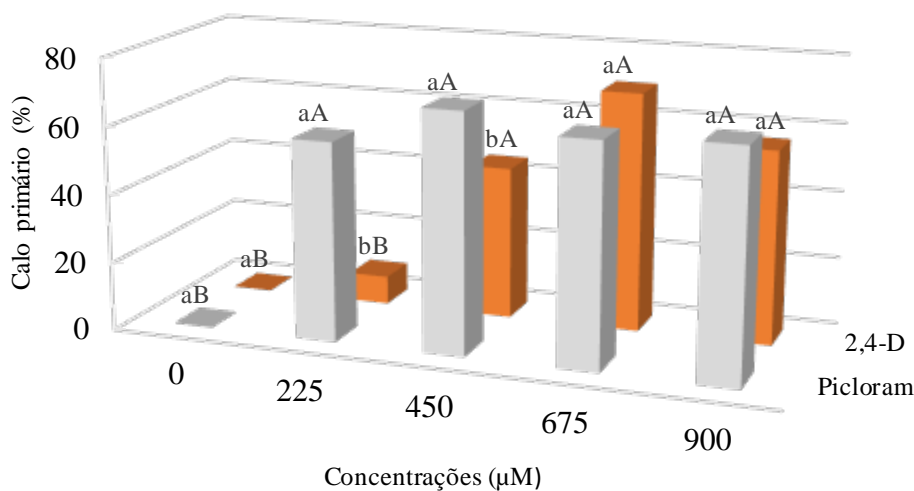


Figura 3. Percentual de calos primários em explantes foliares de gueroba (*Syagrus oleracea*) sob influência de diferentes concentrações de Picloram e 2,4-D. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as auxinas em cada concentração e letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as concentrações, dentro de cada auxina, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Vale mencionar que, embora a taxa de formação de calos primários em explantes sob efeito de 2,4-D tenha sido, de modo geral, alta, o volume de calos formados foi relativamente baixo, diferentemente dos explantes sob efeito de Picloram que exibiram volume significativo de calos. A otimização da produção de calos proporcionada pelo uso da auxina Picloram, durante a indução da embriogênese somática, também tem sido mencionada em outras palmeiras como *Acrocomia aculeata* (MOURA *et al.*, 2008), *A. catechu* (KARUN *et al.*, 2004), *B. gasipaes* (VALVERDE; ARIAS; THORPE, 1987; STEINMACHER; CLEMENT; GUERRA, 2007; STEINMACHER *et al.*, 2007a,b), *C. merrillii* e *C. subinermis* (GOH *et al.*, 1999; GOH *et al.*, 2001), *E. oleracea* (SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2012) e *E. guineensis* (TEIXEIRA *et al.*, 1995; SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2010; SILVA; LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2012). A superioridade do Picloram pode ser atribuída, de acordo com Karun *et al.* (2004), à efetividade na sua absorção e mobilização, bem como a sua rápida metabolização em sítios específicos.

As altas taxas de calos a partir de tecidos foliares imaturos provenientes de uma planta jovem de gueroba não coincidem com os relatos em genótipos de *E. guineensis*

(YUSNITA; HAPSORO, 2011; CORRÊA *et al.*, 2016) e *Phoenix dactylifera* (GUEYE *et al.*, 2009b), os quais, geralmente, são inferiores às taxas obtidas aqui. Yusnita e Hapsoro (2011) relataram, por exemplo, 34,2% como a maior taxa de produção de calos primários obtida em tratamento com 15 μM de 2,4-D a partir de explantes foliares de *E. guineensis*, muito aquém dos 70% obtidos nesse trabalho em 450 μM de Picloram e 675 μM de 2,4-D (Figura 3). Já em *P. dactylifera*, segundo Gueye *et al.* (2009a), a formação de calos é genótipo-dependente e se configura com fator limitante à produção clonal de genótipos elites, o que exige maiores esforços para a compreensão detalhada dos processos envolvidos na iniciação de calos. Baixa calogênese também foi mencionada por Pannetier e Buffard-Morel (1982), em tecidos foliares oriundos de palmeiras adultas de *C. nucifera*.

Aos 210 dias em meio de indução, observaram-se diferenças no padrão morfológico dos calos formados entre as auxinas testadas. Sob efeito do Picloram, foram observados, além de calos translúcidos com bordas irregulares (Figura 4G, 9A), calos nodulares, com coloração bege e consistência mucilaginosa (macia e hidratada) (calo característico do tratamento 225 μM - Figura 4H, 9E) e calos alongados, com coloração variando entre bege e amarelo e consistência compacta (Figura 4I, 9I), estes últimos provenientes, sobretudo, da nervura central dos explantes e observados em maior quantidade. Já os explantes, sob efeito do 2,4-D, exibiram apenas calos translúcidos com bordas irregulares. Vale salientar que, anatomicamente, todos os calos observados exibem uma zona central, composta por células com características meristemáticas, envolvida por uma zona periférica, contendo células com características parenquimáticas (ver seção 3.1.3). Ressalta-se que tais calos, apesar de exibirem uma zona meristemática nítida, posteriormente não formaram embriões somáticos, ou seja, não podem ser considerados embriogênicos. Todavia, dadas as características meristemáticas, tais calos apresentam possível potencial embriogênico, que para ser expresso, exige manipulação posterior de diferentes condições *in vitro*.

Pádua *et al.* (2013) também obtiveram formações calogênicas com diferentes características morfológicas a partir de explantes foliares de *E. guineensis* e, inclusive, criaram tipologias para a classificação desses calos. Esses autores salientaram a dificuldade do uso do critério morfológico na identificação do potencial embriogênico de calos, dada a especificidade das características morfológicas para cada espécie. Daí a pertinência de investigações a nível anatômico e ultraestrutural na identificação de marcadores mais confiáveis e genéricos do potencial embriogênico.

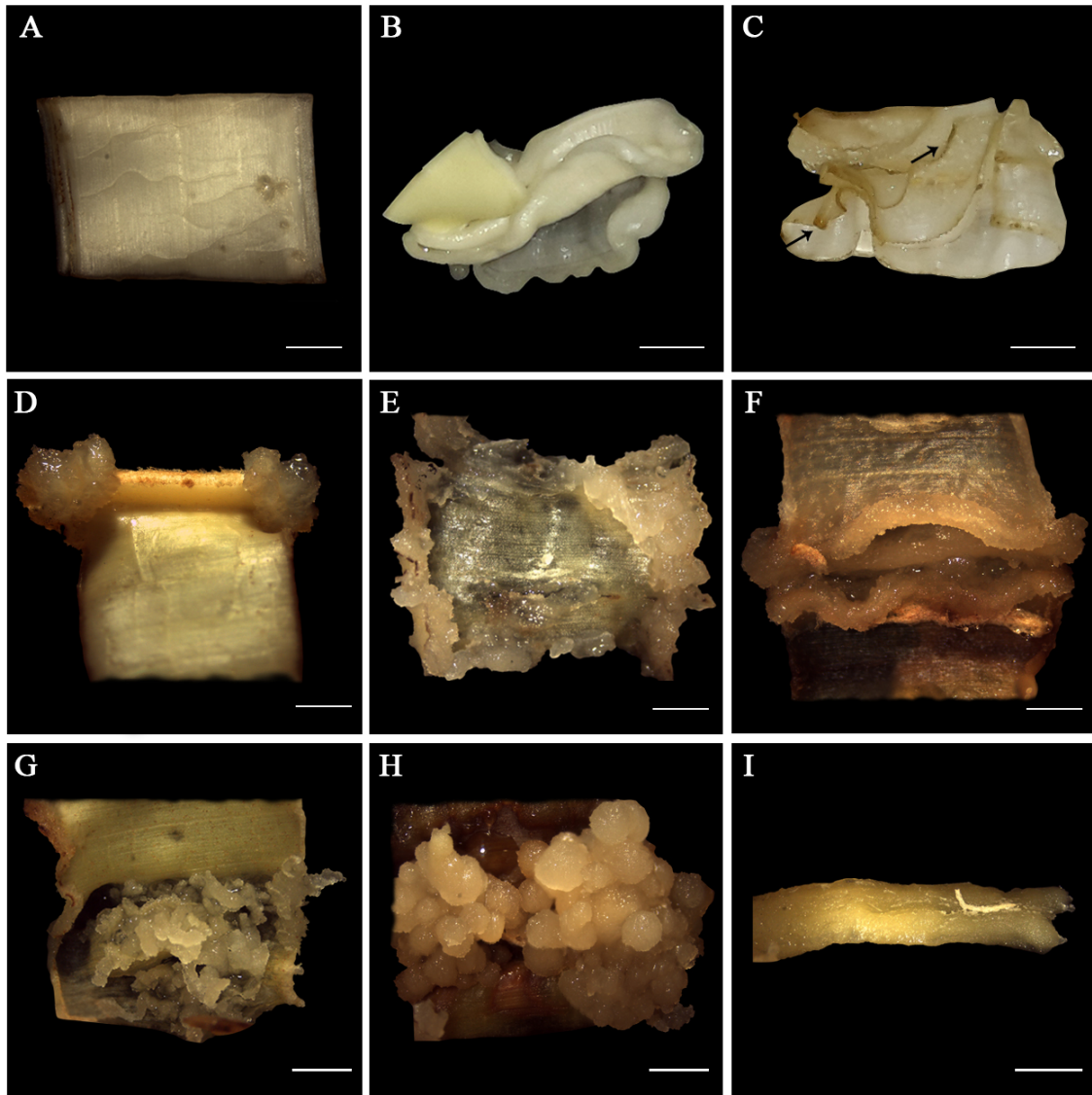


Figura 4. Aspectos morfológicos da indução de calos de gueroba (*Syagrus oleracea*) a partir de tecidos foliares de uma planta jovem. A: Explante imediatamente antes da inoculação. B: Explante intumescido em início de cultivo. C: Explante exibindo leve oxidação nas bordas seccionadas (setas) após sete dias. D: Explante com formações calogênicas incipientes após 30 dias. E: Explante com calo sobre bordas seccionadas após 120 dias. F: Explante com calo sobre nervura central após 120 dias. G: Explante com calos translúcidos com bordas irregulares após 210 dias. H: Explante com calos nodulares mucilaginosos após 210 dias. I: Calo alongado amarelo compacto após 210 dias. Barras = A, D, E-I: 2 mm e B, C: 5 mm.

3.1.2 Multiplicação de calos iniciais e formação de calos embriogênicos

Após o isolamento dos calos provenientes do experimento 2.1.1 e transferência para meio de multiplicação, observou-se a formação de massas de células com consistência mucilaginosa sobre os calos primários (Figura 5A). Após 120 dias no meio mencionado, os calos, a grande maioria sem formato definido e com consistência

mucilaginoso, foram transferidos para meio suplementado com 0,54 μM ANA e 2-iP, em diferentes concentrações. De modo geral, verificaram-se após 270 dias, oxidação expressiva em alguns explantes sob efeito de 2-iP, fato também relatado por Perera *et al.* (2009) em *C. nucifera*, e transição dos calos para uma coloração variando entre amarelo e marrom, consistência menos mucilaginosa (Figura 5B), e, em alguns casos, friável (Figura 5C), caracterizados anatomicamente como embriogênicos – com proembriões (ver seção 3.1.3). A caracterização morfológica do calo embriogênico de gueroba obtido a partir de explantes foliares de uma planta jovem se assemelha com a de Gomes, Bartos e Scherwinski-Pereira (2017) para *E. guineensis*.

Aos 270 dias em meio suplementado com ANA (0,54 μM) e 2-iP (0; 12,30 e 24,60 μM), se determinou a percentagem de calos (aqueles que contêm proembriões), não sendo verificadas diferenças estatísticas entre os tratamentos testados (percentagem média de 30%). O sucesso da combinação auxina e citocinina (mudança da fonte de auxina e adição de citocinina) na expressão da embriogênese somática tem sido relatada por vários autores em diferentes palmeiras (GUERRA; HANDRO, 1988, 1991, 1998; LEDO *et al.*, 2002; EKE; AKOMEAH; ASEMOTA, 2005; ESHRAGHI; ZARGHAMI; MIRABDULBAGHI, 2005; STEINMACHER *et al.*, 2007b; SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2012; BALZON; LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2013; KURUP *et al.*, 2014; SILVA; LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2014). Conforme Lakshmanan e Taji (2000), a eficiência na formação de embriões somáticos promovida pela adição de citocininas parece depender do tipo de auxina usada no processo de indução. Vale mencionar, contudo, que em gueroba o resultado dessa combinação se limitou apenas à formação de calos embriogênicos contendo proembriões que pouco evoluíram.

A transferência dos calos embriogênicos para meio desprovido de regulador de crescimento não promoveu a formação de embriões somáticos a partir de explantes foliares jovens oriundos de uma planta jovem de gueroba.

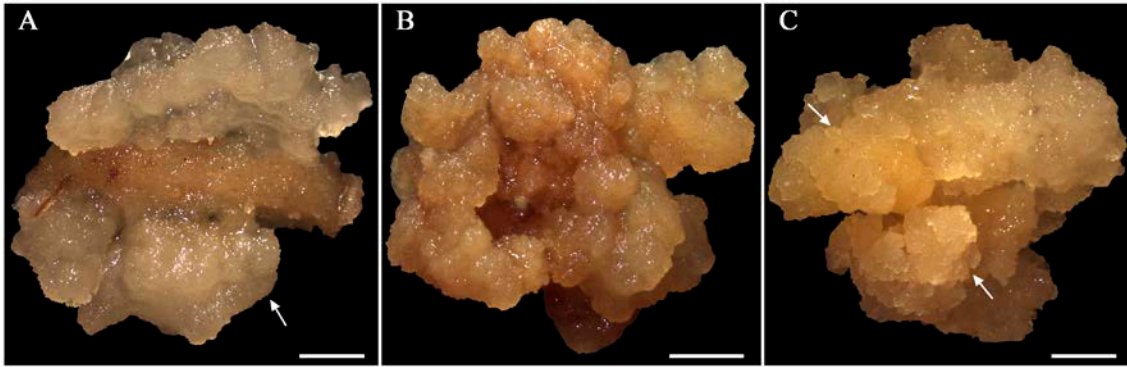


Figura 5. Aspectos morfológicos de calos oriundos de tecidos foliares de uma planta jovem (*Syagrus oleracea*). A: Formação de massa calogênica mucilaginosa. B: Calo embriogênico. C: Calo embriogênico com áreas friáveis (setas). Barras = A-C: 2 mm.

3.1.3 Análises anatômica e histoquímicas

A Figura 6 caracteriza morfoanatomicamente as folhas imaturas de gueroba (*Syagrus oleracea*), oriundas de uma planta jovem, utilizadas como explantes iniciais na indução da embriogênese somática. Em termos morfológicos, a folha imatura de gueroba apresenta superfície lisa, textura maleável, coloração branca (ausência de clorofila) e nervuras paralelas entre si, característica essa, típica do grupo em que está inserida (Monocotiledônea - Liliopsida) (Figura 6A).

Na Figura 6B pode ser verificada a secção transversal do feixe vascular principal, que é colateral, ovóide, composto por um grande cilindro central e cinco traços vasculares isolados, caracterizando elementos vasculares parcialmente diferenciados (Figura 6C, D). Ao redor dessa região vascularizada foi observada uma camada de tecido esclerenquimático (fibras) e, mais internamente, algumas células parenquimáticas, com diâmetro maior que aquelas células do tecido esclerenquimático e de acordo com as análises histoquímicas (coloração com reagentes *Periodic Acid Schiff* – PAS e Lugol), com pequenos depósitos de grãos de amido distribuídos irregularmente. Imediatamente abaixo da epiderme unisseriada, a qual apresenta estômatos nas faces adaxial e abaxial, se verifica uma hipoderme bem desenvolvida, com mais de uma camada de células (Figura 6E).

A secção transversal evidenciou que os explantes foliares, em ambas as faces, apresentam epiderme unisseriada, com células de tamanho homogêneo e justapostas (Figura 6F). Os estômatos são nivelados com as demais células da epiderme e ocorrem na face abaxial (Figura 6F). O mesofilo é constituído pela hipoderme nas duas faces, adjacente à epiderme, e pelo parênquima paliçádico homogêneo, composto por células

tipicamente mais altas que largas, com formato de barras, dispostas em fileiras e de forma compacta e intercaladas por feixes vasculares. Grupos de fibras não vasculares também foram visualizadas, localizadas entre a epiderme e a hipoderme adaxial, e entre a epiderme e a hipoderme abaxial (Figura 6F). Essas observações corroboram com o relatado por Glassman (1972) para folhas de *Syagrus oleracea*. Os feixes vasculares de maior calibre são do tipo colateral fechados, envolto por uma bainha esclerenquimática mais externa e uma parenquimática interna (Figura 6F), enquanto os feixes de menor calibre estão em processo de diferenciação, apresentando apenas bainha parenquimática (Figura 6F, G). As análises histoquímicas, mais especificamente com os reagentes *Periodic Acid Schiff* – PAS e Lugol, revelaram a presença de amiloplastos (grãos de amido) nas células-guardas do complexo estomático e nas bainhas parenquimáticas que envolvem as nervuras de maior e menor calibre (Figura 6G).

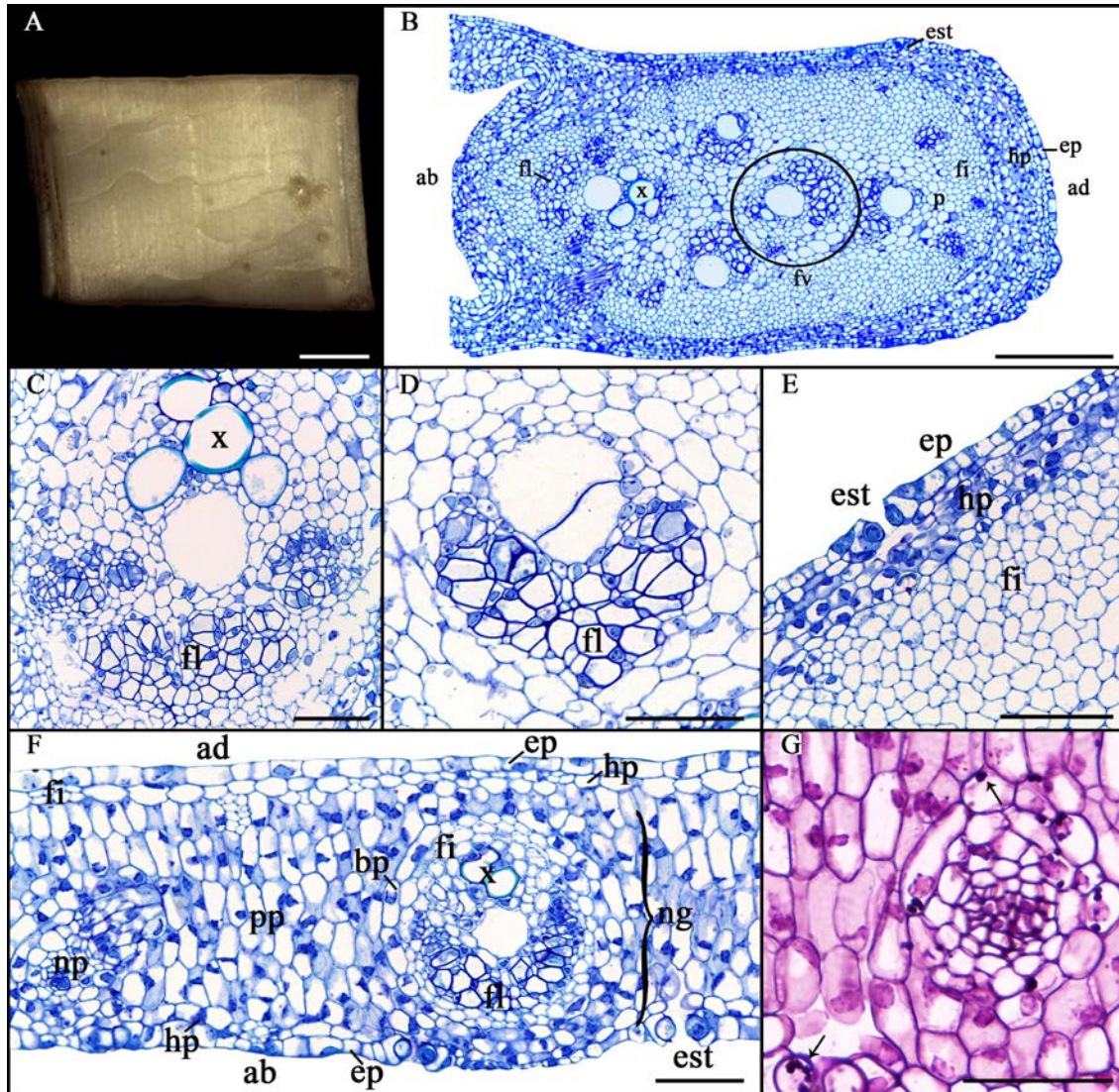


Figura 6. Caracterização morfoanatômica e histoquímica de folhas imaturas oriundas de uma planta jovem de gueroba (*Syagrus oleracea*) utilizadas como explantes iniciais na indução de calos visando à embriogênese somática. A: Aspecto externo de segmentos de folha imatura de gueroba. B: Secção transversal do feixe vascular principal; notar sistema vascular nítido, com tecido esclerenquimático (fibras) ao redor da região vascular. C: Detalhe da nervura principal. D: Detalhe de nervura com menor grau de diferenciação. E: Detalhe da região fibrosa (esclerequimática), hipoderme, epiderme e complexo estomático. F: Secção transversal da lâmina foliar. G: Secção transversal da lâmina foliar corada com Periodic Acid Schiff – PAS, evidenciando a presença de polissacarídeos na bainha parenquimática e estômato. Abreviações: (ab) face abaxial, (ad) face adaxial, (bp) bainha parenquimática, (ep) epiderme, (est) estômato, (fi) fibra – células esclerenquimáticas, (fl) floema, (fv) feixe vascular, (hp) hipoderme, (np) nervura de pequeno calibre, (ng) nervura de grande calibre, (p) parênquima, (pp) parênquima paliádico e (x) xilema. Barras = A: 2 mm; B: 200 μ m e C, D, E, F, G: 50 μ m.

Aos 30 dias em meio de indução foi possível observar a formação de calos primários translúcidos e sem formato específico, sobretudo, nas quinas das folhas (Figura 7A). Segundo as análises anatômicas, em secção transversal, foi possível

verificar células parenquimáticas perivasculares nitidamente intumescidas, dispostas de forma totalmente desorganizada e algumas sem núcleos visíveis (Figura 7B, D).

Concomitantemente ao intumescimento das células parenquimáticas, também se observou a proliferação desorganizada, nas adjacências dos elementos vasculares, de uma nova população de células pequenas, com formato isodiamétrico, algumas com núcleos volumosos evidentes, ou seja, células com características tipicamente meristemáticas. A relação do volume núcleo/citoplasma observada nessas células foi significativamente maior que o observado naquelas células parenquimáticas perivasculares (Figura 7C). A formação dessa nova população de células, provavelmente, deve estar relacionada à reativação da divisão celular a partir de células parenquimáticas (perivasculares e vasculares) e/ou à atividade de células semelhantes às procambiais (pré-existentes no sistema vascular) estimuladas em alta concentração de auxina. São necessários, portanto, estudos ontogênicos mais detalhados para melhor acompanhamento e elucidação desses eventos, como aqueles realizados por Gueye *et al.* (2009a, b) em *P. dactylifera*. Estes autores concluíram que a calogênese inicial em explantes foliares jovens de *P. dactylifera* está relacionada com a reativação de células pouco diferenciadas do parênquima fascicular previamente à desdiferenciação de células parenquimáticas perivasculares. Essas últimas células consideradas competentes (capazes de responder a estímulos externos como auxina exógena) e inicialmente diferenciadas (com vacúolos grandes, únicos e túrgidos e núcleos comprimidos contra a parede celular) se desdiferenciaram e adquiriram capacidade de se dividirem, o que levou à formação de células com características particularmente meristemáticas.

O produto do intumescimento das células parenquimáticas, associado às prováveis divisões mitóticas repetidas e em diferentes direções, provocou claramente uma compressão das células esclerenquimáticas adjacentes e da hipoderme, e o consequente, colapso da epiderme e liberação de uma massa calogênica primária, não embriogênica (Figura 7E). Essa massa foi caracterizada basicamente por células com diferentes formatos (sobretudo, arredondadas e alongadas), vacuoladas, dispersas, com baixa relação núcleo/citoplasma e com poucas organelas, que segundo Carvalho *et al.* (2013), pode ser interpretado como indicativo de baixa atividade metabólica.

Vale mencionar que resíduos fenólicos (Figura 7B-E) que adquirem coloração esverdeada em corante de Azul de Toluidina foram visualizados nas células parenquimáticas intumescidas, bem como nas células com características meristemáticas observadas nas adjacências dos elementos traqueais. Conforme

Alemanno *et al.* (2003), o incremento desses compostos pode ser uma reação de proteção contra as condições estressantes *in vitro* ou ainda uma resposta ao processo de dediferenciação celular.

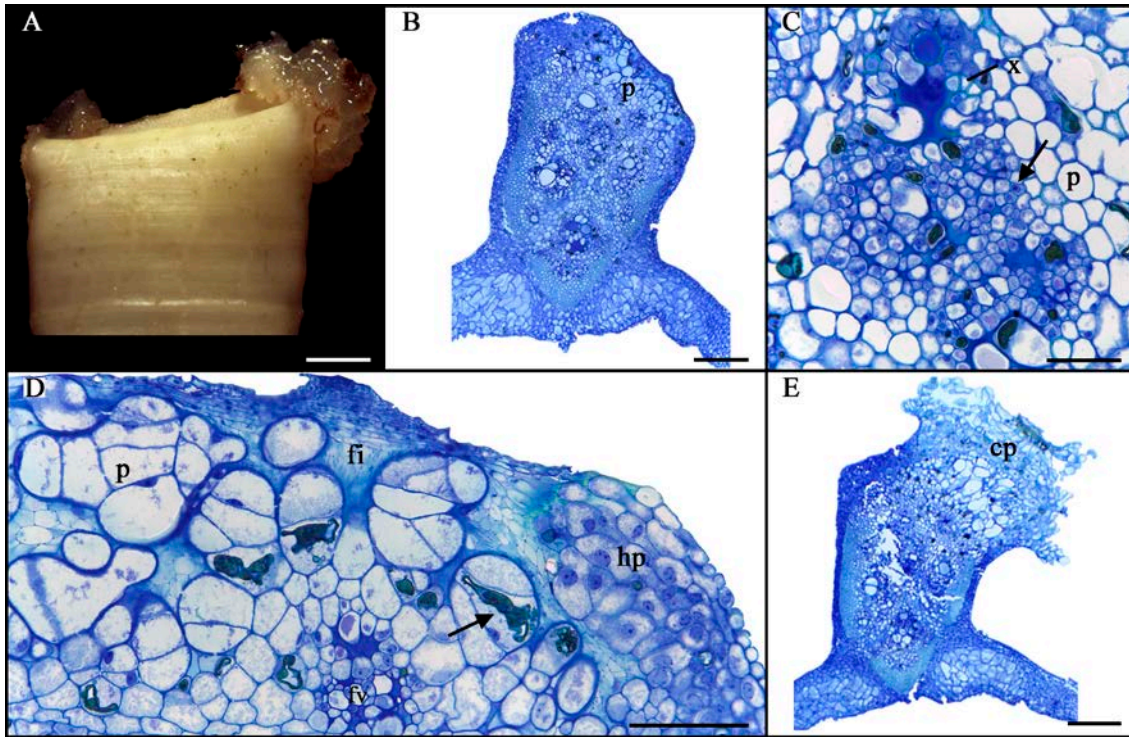


Figura 7. Caracterização morfoanatômica de calos primários formados após 30 dias em meio de indução, a partir de folhas imaturas de uma planta jovem de gueroba (*Syagrus oleracea*) utilizadas como explantes iniciais na indução de calos. A: Calos primários observados nas quinas do explante. B: Secção transversal do feixe vascular principal de uma folha imatura evidenciando intumescimento de células parenquimáticas. C: Proliferação desorganizada de células com características meristemáticas (seta) nas adjacências de elementos vasculares. D: Tecido esclerenquimático e hipodérmico comprimidos por células parenquimáticas perivasculares intumescidas e algumas com compostos fenólicos (seta). E: Colapso da epiderme e liberação de massa calogênica primária. Abreviações: (cp) calo primário, (fi) fibra – células esclerenquimáticas, (fv) feixe vascular, (hp) hipoderme, (p) parênquima e (x) xilema. Barras = A: 2 mm; C, D: 50 μm e B, E: 200 μm.

Após 120 dias em meio de indução, os calos se tornaram mais visíveis e comumente foram visualizados nas bordas seccionadas, certamente, devido ao maior contato com os componentes do meio nutritivo, e na nervura central das folhas (Figura 8). Morfologicamente, a maioria dos calos originados a partir da nervura principal exibiram coloração variando entre bege e amarelo, consistência compacta e formato que se tornava gradualmente alongado (Figura 8A).

Histologicamente, as secções transversais revelaram relação entre a formação desses calos alongados com o feixe vascular principal, uma vez que, como observado na Figura 8, as divisões celulares foram visualizadas nas adjacências do xilema e floema pertencentes ao cilindro vascular principal, provavelmente, a partir de um provável *pool* de células procambias (*stem cells*) localizado nas vizinhanças dos tecidos vasculares e/ou a partir da desdiferenciação de células parenquimáticas (perivasculares e do sistema vascular), o que exige investigação ontogênica mais acurada para afirmação definitiva, como já mencionado. Essas divisões celulares produziram calos compostos, especialmente, por células de tamanho reduzido, citoplasma denso, núcleo evidente e vacúolos fragmentados (quando presentes) (Figura 8B, C), características típicas de células meristemáticas. A proliferação dessas células provocou a compressão de alguns tecidos perivasculares aparentemente em degradação celular (Figura 8C). Nota-se ainda na Figura 8B, rompimento dos tecidos localizados na porção inferior do feixe vascular principal, dado o crescimento do calo, bem como predominância de divisões periclinais, levando ao enfileiramento das células resultantes. As análises histoquímicas com os reagentes *Periodic Acid Schiff* – PAS e Lugol revelaram a presença de amiloplastos (grãos amido) nos calos em crescimento (Figura 8D, E), provavelmente, devido à alta atividade metabólica dentro dessas células após a iniciação de divisões celulares e, posteriormente, tais calos, em crescimento, funcionaram como consumidores.

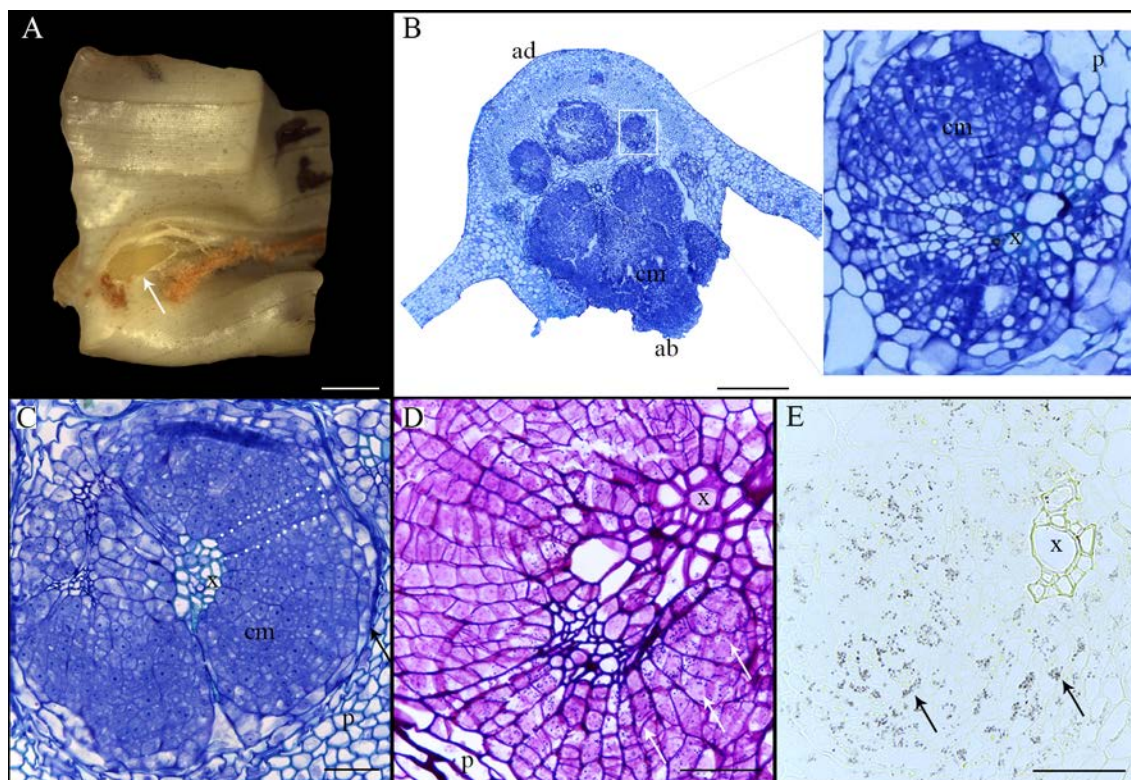


Figura 8. Caracterização morfoanatômica e histoquímica de calos alongados compactos formados após 120 dias em meio de indução, a partir do feixe vascular principal de folhas imaturas de uma planta jovem de gueroba (*Syagrus oleracea*) utilizadas como explantes iniciais na indução de calos. A: Calo alongado surgindo a partir do feixe vascular principal do explante (seta). B: Secção transversal do feixe vascular principal evidenciando calos surgindo dos feixes vasculares. C: Detalhe anatômico do calo com características meristemáticas, causando compressão de alguns tecidos perivasculares (seta); notar divisões celulares periclinais (pontilhado). D: Secção transversal do calo corado com *Periodic Acid Schiff* – PAS, evidenciando a presença de polissacarídeos em células em divisão (setas). E: Secção transversal do calo corado com Lugol, evidenciando a presença de amiloplastos (grãos de amido) em células em divisão. Abreviações: (ab) face abaxial, (ad) face adaxial, (cm) células meristemáticas, (p) parênquima e (x) xilema. Barras = A: 2 mm; B: 500 μ m e C, D, E: 50 μ m.

Schwendiman, Pannetier e Michaux-Ferriere (1988) descreveram eventos semelhantes aos supracitados durante a formação de calos primários a partir de explantes foliares imaturos de *E. guineensis* e atribuíram a origem das células meristemáticas, que posteriormente formaram os calos, à dediferenciação de células perivasculares. A associação entre divisões observadas na zona perivascular e a formação de calos em explantes foliares durante a embriogênese somática tem sido relatada por diversos autores em diferentes palmeiras, como *C. merrillii* e *C. subinermis* (GOH *et al.*, 2001), *C. nucifera* (BUFFARD-MOREL; VERDEIL; PANNETIER, 1992), *E. guineensis* (DUVAL *et al.*, 1995; YUSOFF *et al.*, 2012) e *P. dactylifera*

(SANÉ *et al.*, 2006). De acordo com Yusoff *et al.* (2012), os tecidos vasculares possivelmente absorvem a auxina do meio de cultura por meio das bordas seccionadas dos explantes foliares, o que gera um sinal que é transmitido para células localizadas na área perivascular, levando à desdiferenciação e, conseqüente, formação inicial de calos.

Outra possível vertente aponta as células procambiais (*stem cells* vasculares), que normalmente recrutam a formação dos feixes vasculares (formação dos xilema e floema) dos diferentes órgãos durante o crescimento da planta (FUKUDA, 2004; HE; QU, 2016; CAMPBELL; TURNER, 2017), como uma via alternativa à formação de calos (JIANG *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2014), órgãos (ROSE *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2014) e embriões somáticos (ROSE, 2016). Rose *et al.* (2006) verificaram, por exemplo, a formação de calos que se diferenciaram em raízes a partir de segmentos foliares de *M. truncatula* e sugeriram que a formação dos primórdios radiculares estaria relacionada à estimulação com auxina da divisão de células semelhantes às procambiais, as quais são precursoras de novos nichos de *stem cells* pluripotentes, localizadas dentro dos traços vasculares. Conforme Liu *et al.* (2014), em órgãos aéreos, células procambiais se portariam como um tipo de célula do periciclo.

El Bar e El Dawayati (2014) também associaram a formação direta de embriões somáticos à divisão de células procambiais provenientes da região basal de folhas jovens de *P. dactylifera*. Na literatura outros autores têm acompanhado a formação de embriões somáticos a partir de células procambiais (também conhecidas como provasculares) como, por exemplo, Guzzo *et al.* (1994) e Schmidt *et al.* (1997) em *Daucus carota*, Fernando *et al.* (2003) em *C. nucifera*, Santana-Buzzy *et al.* (2009) e Avilés-Vinãs *et al.* (2013) em *Capsicum chinense* e Wang *et al.* (2011) em *M. truncatula*. Wang *et al.* (2011), todavia, classificaram esse evento como raro. Almeida *et al.* (2012) consideraram células pré-procambiais como nichos de *stem-like cells* totipotentes em *B. gasipaes*.

Essa possível via de origem de estruturas embriogênicas a partir da divisão de *stem cells* vasculares, ou seja, sem a etapa prévia de desdiferenciação, é fortemente sustentada pela expressão do gene SERK1 (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 1*), considerado marcador da competência embriogênica em diferentes espécies de plantas, cuja expressão ocorre comprovadamente em células procambiais e em tecidos vasculares imaturos (KWAAITAAL; VRIES, 2007). Conforme Kwaaitaal e Vries (2007), após tratamento com auxina exógena, algumas dessas células procambiais tornam-se totipotentes na ausência de sinais "vasculares" normais.

A discussão supracitada remete a mais importante, mas também pouco esclarecida parte da embriogênese somática, que consiste na transição de células somáticas para células referidas como embriogênicas, capazes de formar embriões somáticos (JONG *et al.*, 1992), o que precisa ser melhor elucidado em espécies de palmeiras. Definições de quais células somáticas se tornam embriogênicas, quando e como essa transição ocorre devem ser melhor investigadas. Vale mencionar, no entanto, que os calos originados nesse trabalho, nas adjacências dos elementos condutores (traqueais), que apresentavam inicialmente características típicas meristemáticas, consideradas por muitos autores sinônimo de embriogênicas, com os subcultivos contínuos, transitaram para calos com regiões celulares distintas, algumas não necessariamente com características meristemáticas, como discutido a seguir.

Aos 210 dias em meio de indução, os calos com características morfológicas distintas foram caracterizados em termos anatômicos e histoquímicos (*Periodic Acid Schiff* – PAS, Lugol e *Xylidine Ponceau* – XP), o que evidenciou, inclusive, muitas semelhanças entre si (Figura 9). Embora externamente diferentes, os calos formados a partir de explantes foliares de gueroba exibiram basicamente duas regiões celulares distintas. Na região periférica do calo, foram observadas células isodiamétricas, com formato predominantemente arredondado, citoplasma pouco denso, núcleos pequenos em relação ao tamanho total da célula, porém, evidentes, vacúolos ocupando grande volume celular e alguns nitidamente imprensando os núcleos contra a parede celular delgada, ou seja, características basicamente de células parenquimáticas (Figura 9B, F, J). Já, na região interna das formações calogênicas, se constatou a presença de uma zona tipicamente meristemática, caracterizada por apresentar células pequenas, isodiamétricas, com citoplasma denso, núcleos volumosos, vacúolos, quando presentes, fragmentados (pequenos) e intensa divisão celular (Figura 9B, F, J).

Vale mencionar, contudo, que uma terceira camada, mais externa, formada basicamente por células arredondadas, com amplos espaços intercelulares, vacúolos bem desenvolvidos e núcleos poucos evidentes, foi observada, sobretudo, em calos caracterizados como translúcidos, com bordas irregulares (Figura 9B). Padrão anatômico muito semelhante ao citado foi relatado por Buffard-Morel, Verdeil e Pannetier (1992) em *C. nucifera*, por Gueye *et al.* (2009b) em *P. dactylifera* e por Gomes, Bartos e Scherwinski-Pereira (2017) em *E. guineensis*, todos em calos provenientes de explantes foliares.

Em termos histoquímicos, mais especificamente, com relação a presença de polissacarídeos, os corantes *Periodic Acid Schiff* – PAS e Lugol revelaram concentração relativamente alta de amiloplastos, contendo um número variado de grãos de amido, localizados, sobretudo, ao redor dos núcleos das células parenquimáticas adjacentes às células meristemáticas (Figura 9C, D, G, H, K, L). Os grãos de amido visualizados possivelmente têm como função, o fornecimento de energia às células adjacentes que se encontram em intensa divisão celular (PLATA; BALLESTER; VIEITEZ, 1991; CANHOTO; CRUZ, 1996; RODRIGUEZ; WETZSTEIN, 1998). Amiloplastos também foram visualizados nas células meristemáticas, porém, em menor quantidade. Essa relação inversamente proporcional verificada entre acúmulo de amido e atividade mitótica também foi relatada por Benelli *et al.* (2001), Moura *et al.* (2008) e Guedes *et al.* (2011).

De modo geral, vários trabalhos de diferentes espécies de monocotiledôneas e dicotiledôneas têm associado o acúmulo de grãos de amido, nas células adjacentes às células embriogênicas e/ou nas células embriogênicas, com a capacidade de formar embriões somáticos (HALPERIN; JENSEN, 1967; LU; VASIL, 1985; PLATA; BALLESTER; VIEITEZ, 1991; BUFFARD-MOREL; VERDEIL; PANNETIER, 1992; BARCIELA; VIEITEZ, 1993; VIEITEZ, 1995; YEUNG, 1995; RODRIGUEZ; WETZSTEIN, 1998; SAMAJ *et al.*, 1999; VERDEIL *et al.*, 2001; MIKULA *et al.*, 2004; SANÉ *et al.*, 2006; MOTOIKE *et al.*, 2007; PAN *et al.*, 2011; STEINMACHER *et al.*, 2011; YUSOFF *et al.*, 2012). Todavia, essa correlação não está totalmente elucidada (MOURA *et al.*, 2008; ROCHA *et al.*, 2012; ROCHA *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2017) e segundo Schwendiman, Pannetier e Michaux-Ferriere (1988) e Steinmacher *et al.* (2011), não se trata de uma correlação sistemática. Portanto, acúmulo de grãos de amido não pode ser considerado um marcador histoquímico do processo de embriogênese somática (BARCIELA; VIEITEZ, 1993; CANHOTO; MESQUITA; CRUZ, 1996).

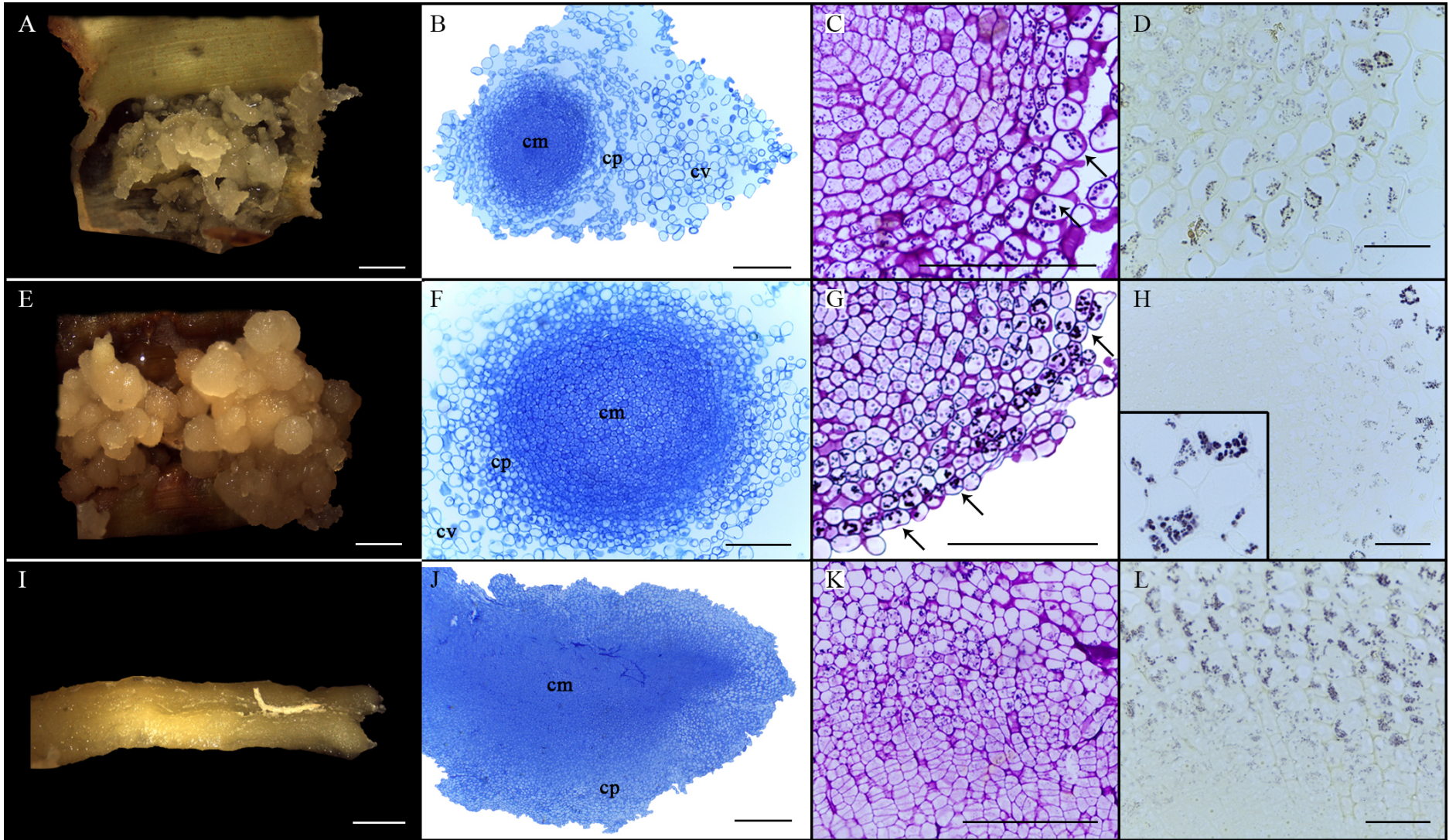


Figura 9. Análises anatômica e histoquímica de diferentes linhagens de calos obtidos a partir de tecidos foliares de gueroba (*Syagrus oleracea*) e corados com *Periodic Acid Schiff* – PAS e Lugol. A: Explante com calos translúcidos com bordas irregulares. B: Secção longitudinal do calo translúcido com bordas irregulares, evidenciando células meristemáticas na região central. C, D: Calo translúcido com bordas irregulares com acúmulo de amido (seta) na região periférica. E: Explante com calos nodulares mucilaginosos. F: Secção longitudinal do calo nodular, evidenciando células meristemáticas na região central. G, H: Calo nodular com acúmulo de amido (seta) na região periférica. I: Calo alongado, amarelo e compacto. J: Secção longitudinal do calo alongado, evidenciando células meristemáticas na região central. K, L: Calo alongado com acúmulo de amido na região periférica. Abreviações: (cm) células meristemáticas, (cp) células parenquimáticas e (cv) células vacuoladas. Barras = A, E, I: 2 mm, B, C, E, F, G, K: 200 µm; D, H, L: 50 µm e J: 500 µm.

A análise ultraestrutural do calo translúcido com bordas irregulares revela que as células das camadas consideradas parenquimáticas e meristemáticas são metabolicamente ativas (Figura 10), o que é demonstrado pela presença de organelas, como mitocôndrias e Complexo de Golgi, além de ribossomos livres em abundância (Figura 10B, C). As células da camada meristemática exibem notadamente alta relação núcleo/citoplasma (Figura 10D, E), além de vacúolos menores (Figura 10D).

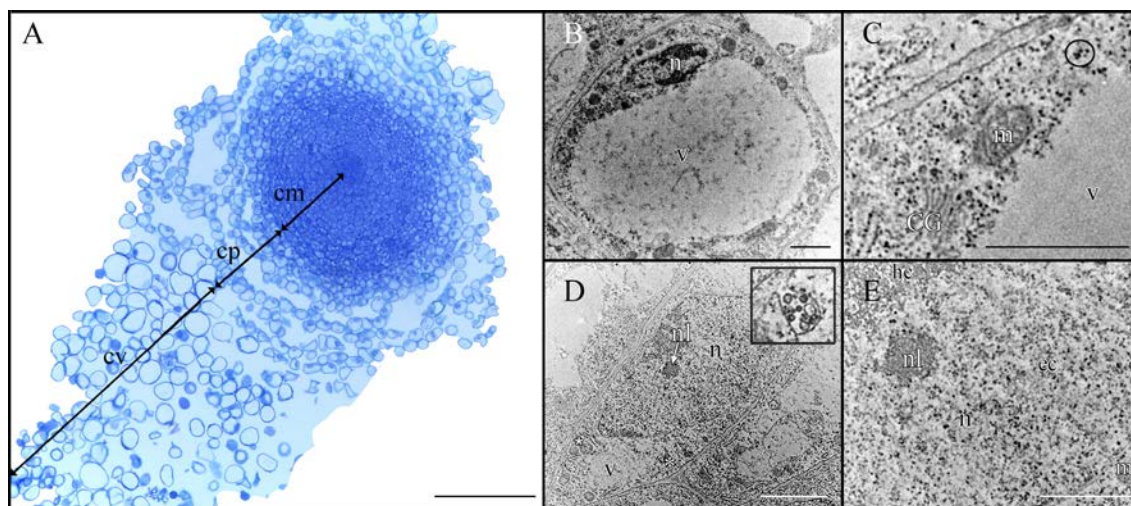


Figura 10. Caracterização anatômica e ultraestrutural de calo translúcido com bordas irregulares. A: Camadas celulares anatomicamente distintas (células meristemáticas, células parenquimáticas e células vacuoladas). B: Análise ultraestrutural de célula da camada parenquimática. C: Célula parenquimática em intensa atividade metabólica evidenciada pelo complexo de organelas, como mitocôndrias, Complexo de Golgi e ribossomos livres (círculo). D: Análise ultraestrutural de célula da camada meristemática em intensa atividade metabólica. Detalhe de corpo multivesicular visualizado na parede celular (quadrado). E: Núcleo de célula meristemática. Abreviações: (cm) células meristemáticas, (cp) células parenquimáticas, (cv) células vacuoladas, (ec) eucromatina, (hc) heterocromatina, (m) mitocôndria, (n) núcleo, (nl) nucléolo, (r) ribossomos, (v) vacúolo e (CG) Complexo de Golgi. Barra: A: 2 mm; B, D: 1 μ m e C, E: 0,5 μ m.

Como mencionado nesse trabalho e em diversos outros, a embriogênese somática indireta tem como produto diferentes tipos de calos, alguns, contudo, com maior potencial embriogênico que outros, o qual pode ser melhor identificado com base em análises anatômicas, histoquímicas e ultraestruturais (VERDEIL *et al.*, 2001; NA *et al.*, 2007; PÁDUA *et al.*, 2013).

Os calos supracitados, embora exibam centros meristemáticos bem definidos, não foram capazes de originar embriões somáticos. San-José *et al.* (2010) levantam o questionamento, com base em conceitos de Fehér (2006), se esses calos com células

tipicamente meristemáticas seriam células embriogenicamente competentes, mas que ainda necessitam de sinais externos e/ou celulares que permitam a expressão do programa embriogênico.

Calos classificados como embriogênicos (Figura 11), bem como calos com iniciação de primórdios radiculares (Figura 13), foram observados aos 270 dias em meio suplementado com ANA e 2-iP. Os calos considerados embriogênicos foram caracterizados pelo predomínio de células embriogênicas em proliferação e de proembriões, ambos distribuídos sobretudo na região periférica dos calos (Figura 11B - H).

As células embriogênicas apresentavam, assim como relatado por Verdeil *et al.* (1994, 2001) em *C. nucifera*, citoplasma denso, núcleo central largo com um nucléolo conspicuo e densamente corado, alta relação núcleo/citoplasma, vacúolos fragmentados e paredes celulares nitidamente mais espessas (Figura 11B-E), com nítida deposição de calose (β - 1,3 - glucanas), evidenciada pela intensa fluorescência observada mediante coração com Azul de Anilina e exposição à luz ultravioleta (Figura 11F-H). As células no interior dos proembriões, provenientes de divisões mitóticas dessas células embriogênicas supracitadas, apresentavam-se também isoladas fisicamente, por meio de uma parede celular espessa (rica em calose) (Figura 11C-H), das células vacuoladas adjacentes que se encontravam em nítido processo de degeneração.

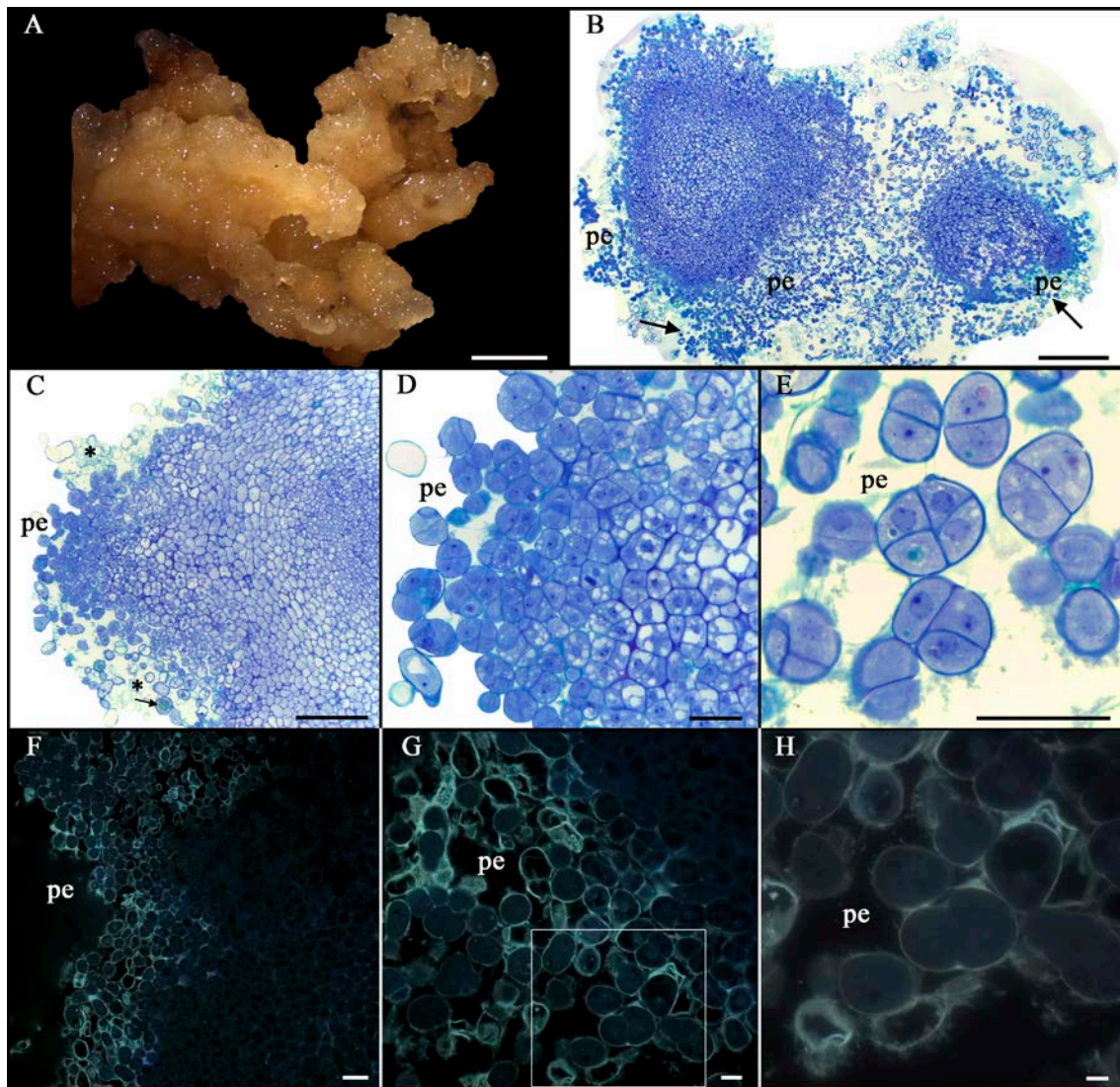


Figura 11. Aspectos morfológicos e anatômicos de calo embriogênico obtido a partir de tecidos foliares de gueroba (*Syagrus oleracea*). A: Morfologia externa. B: Secção anatômica de calo embriogênico com células embriogênicas e proembriões na periferia, indicados por setas. C, D, E: Células embriogênicas, proembriões, células em degradação (*) e compostos fenólicos corados de verde (seta). F, G, H: Calose identificada por meio de coração com Azul de Anilina e exposição à luz ultravioleta. Abreviações: (pe) proembriões. Barras = A: 2 mm; B: 500 μ m; C: 200 μ m; D, E, F: 50 μ m; G: 20 μ m e H: 10 μ m.

Observou-se também ao redor das células embriogênicas e dos proembriões resultantes uma mucilagem polissacarídica fortemente corada com PAS (Figura 12A-C) que, conforme Goh *et al.* (2001), é consequente de modificações da lamela média e parede primária celular e é um indicativo de qualidade celular para o desenvolvimento subsequente.

A deposição de calose é considerada um marcador das primeiras modificações metabólicas que conduzem à embriogênese somática (DUBOIS *et al.*, 1990; PEDROSO; PAIS, 1992) e previne a interferência de células adjacentes que estão em

processo de degeneração ou determinadas a seguirem outras vias (WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986). Alguns autores propõem que tal evento possibilita a interrupção da comunicação célula-a-célula, o que promove proteção contra as condições ambientais inapropriadas (LELJAK-LEVANIĆ; MIHALJEVIC; BAUER, 2015), geralmente, estressantes, típicas do processo de embriogênese somática e que esse isolamento pode estimular a reprogramação de células embriogenicamente competentes e, então, induzir o desenvolvimento do embrião somático de origem unicelular (YOU; YI; CHOI, 2006). Vale salientar que a calose é naturalmente uma resposta fisiológica comum a diferentes estresses (ZAVALIEV *et al.*, 2011), o que suporta a hipótese que a embriogênese somática seja uma resposta de adaptação do genoma vegetal ao estresse do cultivo *in vitro* (DUDITS *et al.*, 1995; KARAMI; SAID, 2010; JIN *et al.*, 2014; NOWAK; GAJ, 2016).

Além de promover o isolamento, os produtos da degradação da calose depositada ao redor de células individuais ou agregados de células embriogênicas exercem provável papel de sinalização, essencial para o crescimento e desenvolvimento da futura planta (LELJAK-LEVANIĆ; MIHALJEVIC; BAUER, 2015), mimetizando, provavelmente, compostos e/ou estruturas que na natureza suportam o desenvolvimento de embriões zigóticos, como o endosperma e tecido materno (MATTHYS-ROCHON, 2005).

Segundo Verdeil *et al.* (2001), as alterações ultraestruturais observadas durante a formação de células embriogênicas e de consequentes proembriões, relacionadas sobretudo às modificações na parede celular (deposição de calose) e eventos nucleares, são semelhantes aos observados durante a fase gametofítica (formação de células de gametas femininos) em plantas de reprodução sexuada, o que evidencia fortes similaridades entre as embriogêneses zigótica e somática.

Além da presença de calose nas paredes celulares e da mucilagem polissacarídica, também se verificaram, em algumas células embriogênicas, a presença de grãos de amido (Figura 12C). Em adição a esses componentes, compostos fenólicos (corados de laranja) (Figura 12D, E) e corpos proteicos também foram visualizados em algumas células embriogênicas e em proembriões mediante reação com corante XP (Figura 12D-F). Polissacarídeos de parede, compostos fenólicos e conteúdo proteico citoplasmático abundante também foram relatados por Almeida *et al.* (2012) em células embriogênicas de *B. gasipaes* e de acordo com esses autores, confere um indicativo da competência para a via da embriogênese somática. Os corpos proteicos, assim como

grãos de amido, de acordo com Silva *et al.* (2015), funcionam como fonte de energia que subsidiam o crescimento e proliferação celular ocorridos durante o processo de embriogênese somática. Calos compostos por células embriogênicas e/ou proembriões exibindo corpos proteicos também foram observados em *Musa* spp. (GRAPIN; SCHWENDIMAN; TEISSON, 1996) e *Zea mays* (SAMAJ *et al.*, 1999).

Na embriogênese somática, os efeitos de diferentes compostos fenólicos presentes no meio de cultivo têm variado em diversas culturas, com efeitos inibitórios relatados em *Coffea canephora* (NIC-CAN *et al.*, 2015) e positivos na indução de estruturas embriogênicas de *Gossypium hirsutum* (KOUAKOU *et al.*, 2007) e nos estádios iniciais de diferenciação do embrião somático de *Feijoa sellowiana* (REIS; BATISTA; CANHOTO, 2008), contudo, o seu papel na embriogênese somática continua pouco elucidado.

Por outro lado, os corantes PAS e Lugol não revelaram a presença significativa de amiloplastos nas células dos proembriões (Figura 12B), o que coincide com os resultados de Verdeil *et al.* (2001) em *C. nucifera*, Goh *et al.* (2001) em *C. merrillii* e *C. subinermis*, Moura *et al.* (2008) em *A. aculeta* e Almeida *et al.* (2012) em *B. gasipaes*. Acredita-se que o amido é consumido rapidamente durante a formação das áreas embriogênicas e é ausente em embriões somáticos em estádios mais avançados de desenvolvimento (RODRIGUEZ; WETZSTEIN, 1998; QUIROZ-FIGUEROA *et al.*, 2002) e que a sua rápida hidrólise além de fornecer energia e carbono para proliferação, exerceria um possível papel regulatório (PUIGDERRAJOLS; MIR; MOLINAS, 2001).

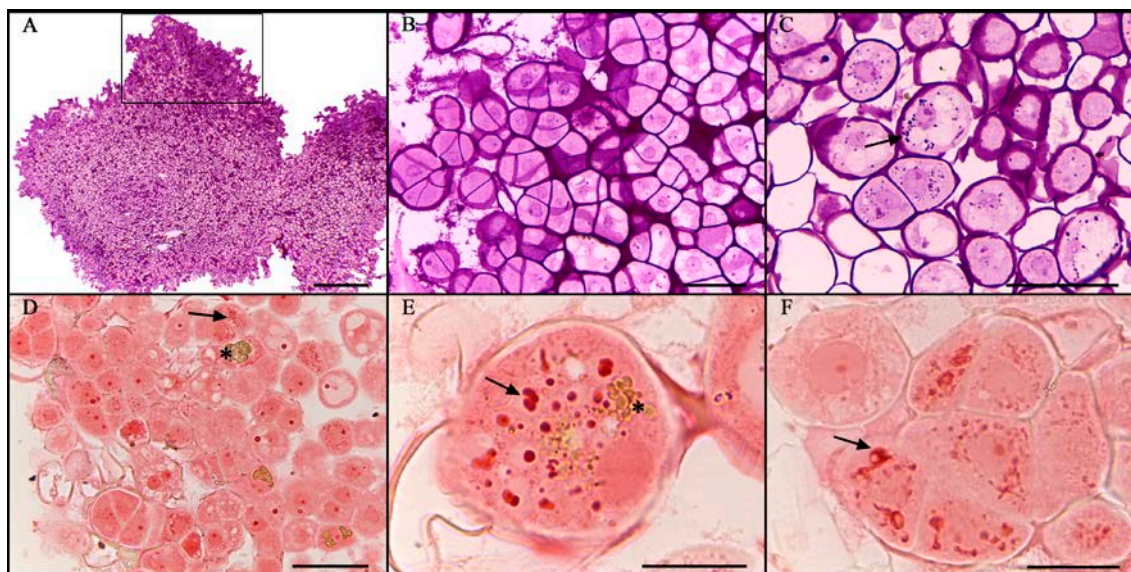


Figura 12. Aspectos histoquímicos de calo embriogênico obtido a partir de tecidos foliares de gueroba (*Syagrus oleracea*) submetidos à indução de calos visando à embriogênese somática. A: Mucilagem polissacarídica, fortemente corada com PAS na região periférica do calo (retângulo). B: Proembriões desprovidos de amiloplastos embebidos em mucilagem polissacarídica. C: Células embriogênicas com amiloplastos (seta). D: Calo embriogênico com corpos proteicos (seta) e compostos fenólicos (*). E: Detalhe dos corpos proteicos (seta) e compostos fenólicos (*). F: Proembrião com corpos proteicos. Barras = A: 500 µm; B, D: 50 µm e C, E, F: 20 µm.

A formação de embriões somáticos a partir de proembriões, também conhecidos como proembriões, agregados embriogênicos, complexos embriogênicos, tem sido relatada por diversos autores em diferentes espécies (KONAR; THOMAS; STREET, 1972; THOMAS; KONAR; STREET, 1972; VASIL; VASIL, 1982; HO; VASIL, 1983; BOTTI; VASIL, 1984; LU; VASIL, 1985; VERDUS *et al.*, 1993; GUZZO *et al.*, 1994; RONCHI; GIORGETTI, 1995; SCHUMANN *et al.*, 1995; ALEMANNI; BERTHOULY; MICHAUX-FERRIÈRE, 1996; GRAPIN; SCHWENDIMAN; TEISSON, 1996; GOH *et al.*, 2001; PUIGDERRAJOLS; MIR; MOLINAS, 2001; VON ARNOLD *et al.*, 2002; TARRÉ *et al.*, 2004; SANÉ *et al.*, 2006; NA *et al.*, 2007; MOURA *et al.*, 2008; BORJI *et al.*, 2017) e tem sido considerada via típica da origem unicelular de embriões somáticos (HO; VASIL, 1983; BOTTI; VASIL, 1984; LU; VASIL, 1985; MICHAUX-FERRIÈRE; GROUT; CARRON, 1992; ALEMANNI; BERTHOULY; MICHAUX-FERRIÈRE, 1996; GRAPIN; SCHWENDIMAN; TEISSON, 1996; GOH *et al.*, 2001; VERDEIL *et al.*, 2001; MOURA *et al.*, 2008). Contudo, no presente trabalho, não se observou a formação de embriões somáticos a

partir das massas proembriogênicas supracitadas, que se limitaram a poucas divisões celulares.

Essas massas proembriogênicas são consideradas por Vries *et al.* (1988) um pré-requisito fundamental à embriogênese somática e são descritas por eles como intermediários estáveis na via morfogênica de transição de células simples em embriões somáticos ou, ainda, como o primeiro estágio distinto e diferenciado da embriogênese somática. Para a transição dos proembriões em embriões globulares com protoderme desenvolvida, muitos autores mencionam a necessidade de redução ou remoção completa do regulador de crescimento (HALPERIN; JENSEN, 1967; VRIES *et al.*, 1988; FRANSZ; SCHEL, 1991), o que foi realizada nesse trabalho, contudo, não proporcionou essa transição.

Além dos calos embriogênicos mencionados, aos 270 dias em meio suplementado com ANA e 2-iP, foram observados calos com formação de primórdios radiculares (Figura 13), um evento que pode ser recorrente em experimentos de indução de embriogênese somática (SCHWENDIMAN; PANNETIER; MICHAUX-FERRIERE, 1988; BUFFARD-MOREL; VERDEIL; PANNETIER, 1992; TARRÉ *et al.*, 2004; GUEYE *et al.*, 2009b), o qual pode ser relacionado com o decréscimo dos níveis de auxina (MATSUOKA; HINATA, 1979). Esses calos apresentavam indícios de diferenciação de zonas estruturais típicas de raízes, como coifa, columela e procâmbio (Figura 13). Compostos fenólicos (Figura 13B, D), assim como grãos de amido, foram observados na zona em diferenciação em possível procâmbio (Figura 13D). Grãos de amido também foram observados nas células de uma zona similar à columela (Figura 13E), assemelhando-se a estatócitos.

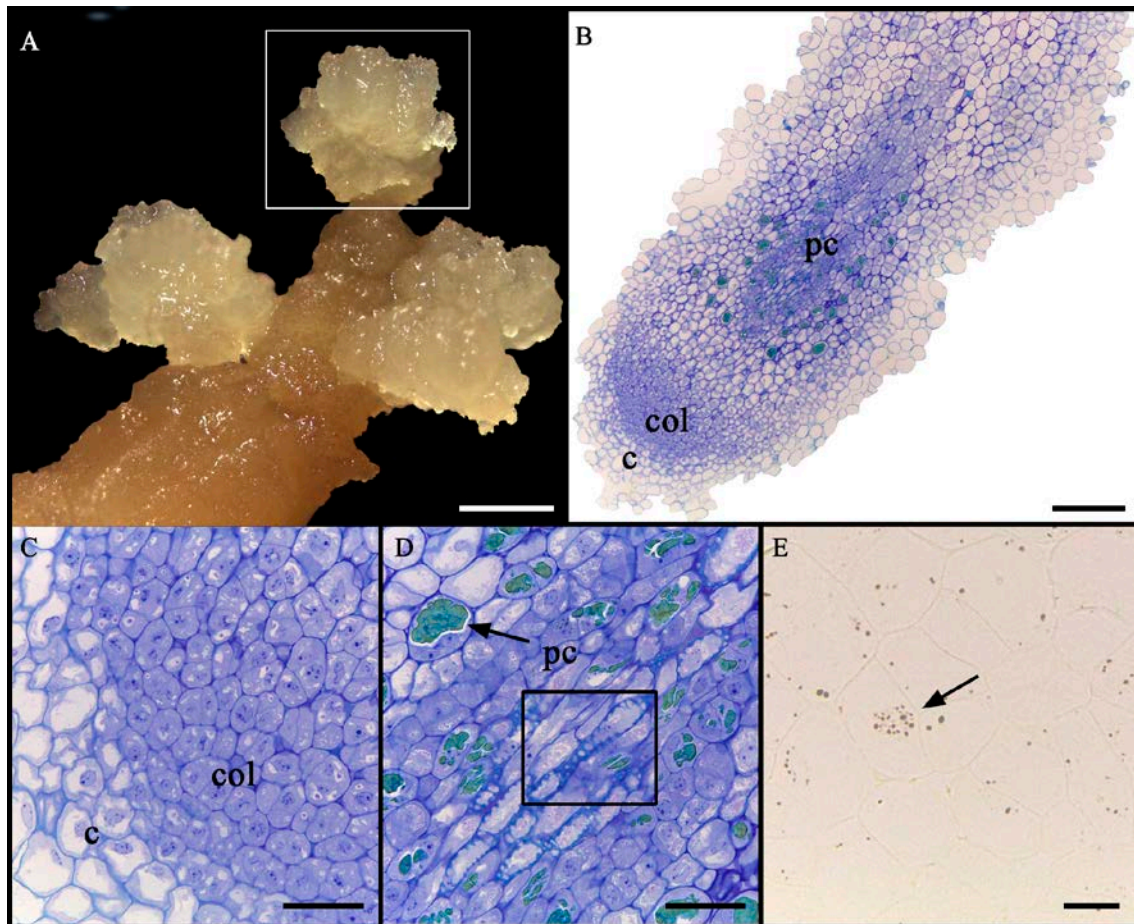


Figura 13. Formação de primórdios radiculares a partir de calos oriundos de explantes foliares de uma planta jovem de gueroba (*Syagrus oleracea*) cultivados em meio suplementado com ANA e 2-iP. A: Calo alongado com formação de primórdios radiculares na região periférica. B: Secção anatômica de primórdio radicular. C: Região anatômica com características de coifa e columela. D: Região anatômica com características de procâmbio, com elementos de vaso em diferenciação (no quadrado em destaque) e presença de compostos fenólicos corados de verde (seta). E: Amiloplastos localizados na zona semelhante à columela. Abreviações: (pc) procâmbio, (c) coifa e col (columela). Barras = A: 2 mm; B: 200 μ m e C, D, E: 50 μ m.

3.2 Influência do meio de cultura, das regiões do palmito e da posição dos explantes

3.2.1 Indução de calos

Após estabelecimento da combinação auxina – concentração mais responsiva na formação de calos, foi avaliada a influência das formulações salinas do meio de MS e Y3, das regiões do palmito utilizadas para obtenção dos explantes e da posição dos explantes no meio de cultura (Figura 14A, B), na indução de calos a partir de tecidos foliares obtidos de uma planta adulta de gueroba.

Intumescimento, com conseqüente aumento do tamanho do explante, alteração da textura foliar para mais consistente ou quebradiça e oxidação discreta foram observados na primeira semana em meio de indução. Após 15 dias em meio de cultura, o intumescimento se tornou mais evidente, com destaque para os explantes provenientes das regiões proximal e mediana, independente da formulação salina e da posição do explante no meio.

Aos 30 dias de cultivo foi observado leve oxidação nas folhas superiores de alguns poucos explantes e início de calos em explantes em meio Y3, dispostos horizontalmente e provenientes da região distal. Aos 90 dias em meio de indução, as formações calogênicas primárias (translúcidas com bordas irregulares e consistência mucilaginosa) se tornaram mais expressivas, sobretudo, nos explantes em meio Y3 e nas quinas das nervuras centrais (Figura 14C). Formações semelhantes a cristais também foram notadas sobre a nervura central, principalmente, naqueles explantes posicionados verticalmente (Figura 14C).

Aos 120 dias pós inoculação, três tipos de calos foram observados: calo sem forma definida, com coloração bege e consistência mucilaginosa, localizado, notadamente, nas bordas foliares e nervura central das folhas (Figura 14D); calo alongado de menor diâmetro, com coloração variando entre branco e bege e consistência mucilaginosa, distribuído ao longo de todo explante (bordas, nervura central e superfície foliar) (Figura 14E) e calo alongado de maior diâmetro, com coloração variando entre bege e amarelo e consistência compacta proveniente da nervura central das folhas (Figura 14F), esse último observado com maior frequência.

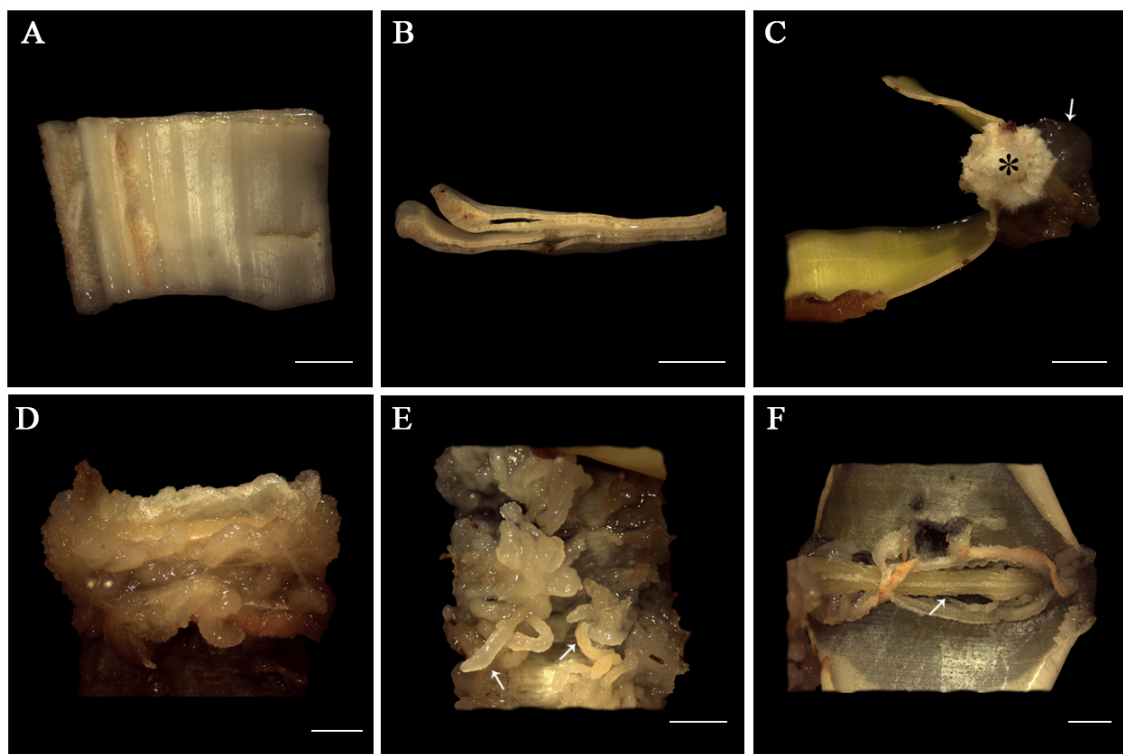


Figura 14. Aspectos morfológicos da indução de calos de gueroba (*Syagrus oleracea*) a partir de tecidos foliares de uma planta adulta. A: Explante em posição horizontal imediatamente antes da inoculação. B: Explante em posição vertical imediatamente antes da inoculação. C: Explante exibindo formações semelhantes a cristais em uma extremidade da nervura central (*) e calos primário na outra extremidade da nervura central (em contato com o meio de cultura) (seta) após 90 dias em meio de indução. D: Explante com calo sem forma definida sobre nervura central após 120 dias em meio de indução. E: Explante com calos alongados de menor diâmetro (seta) sobre tecido foliar após 120 dias em meio de indução. F: Explante com calo alongado (seta) de maior diâmetro, proveniente da nervura central, após 120 dias em meio de indução. Barras = 2 mm.

Avaliação do percentual de oxidação e de calos primários formados (Figura 15) foi realizada aos 150 dias de cultivo. Segundo as análises, a taxa de oxidação só foi significativamente influenciada pelo fator posição do explante no meio de cultura, com destaque para a posição horizontal que proporcionou 83,33%, enquanto que a posição vertical proporcionou 68,4% de oxidação. Verificou-se que a ocorrência de alta oxidação nos explantes não afetou de forma negativa a taxa de formação de calos.

Já a formação de calos foi significativamente influenciada pelas formulações salinas do meio e regiões do palmito utilizadas para obtenção dos explantes (Figura 15). O desdobramento da interação entre esses dois fatores (meio dentro de cada região) revelou que a percentagem de calos primários foi significativamente superior em meio Y3 que em MS para os explantes provenientes das regiões mediana e proximal. Já

segundo o desdobramento das regiões dentro de cada meio, as três regiões do palmito testadas em meio Y3 foram igualmente eficientes na formação de calos (distal – 92,7%, mediana – 91,6% e proximal – 71,8%). Por outro lado, a região distal do palmito exibiu maior percentagem de formação de calos (84,4%) que as demais regiões testadas quando inoculada em meio MS.

O destaque, de modo geral, do meio Y3, sugere sua maior eficiência na indução de calos a partir de tecidos foliares imaturos provenientes de uma planta adulta. Essa formulação estabelecida inicialmente por Eeuwens em 1976, especificamente para o cultivo *in vitro* de *C. nucifera*, é caracterizada comparativamente ao MS, pela menor concentração de nitrogênio e maiores níveis de potássio, cobre e cobalto e tem sido aplicada com sucesso no processo embriogênico de diferentes palmeiras (TEIXEIRA; SONDAHL; KIRBY, 1994; LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2014; JAYANTHI *et al.*, 2015; NGUYEN *et al.*, 2015).

Analisando os efeitos simples do fator posição do explante no meio, a posição horizontal se sobressaiu estatisticamente, proporcionando 75% de calos, em relação aos 62,5% observados nos explantes posicionados verticalmente no meio. Essa superioridade da posição horizontal, deve-se, provavelmente, ao maior contato do explante e, principalmente, do feixe vascular principal (região considerada mais responsiva com base nas análises anatômicas) com os compostos do meio de cultivo.

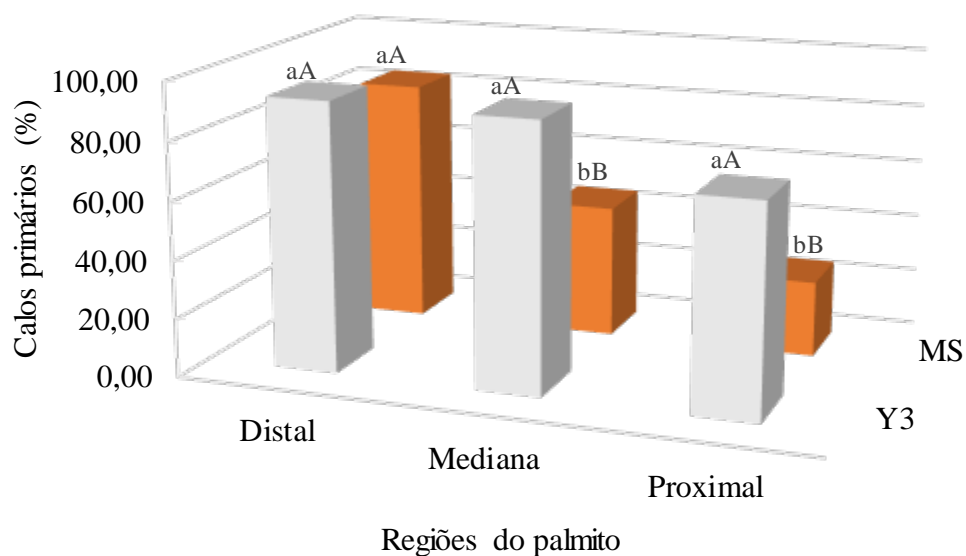


Figura 15. Formação de calos primários em explantes foliares de gueroba (*Syagrus oleracea*) sob influência de formulações salinas do meio Y3 e MS e diferentes regiões do palmito. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os meios de cultura em cada região do palmito e letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as regiões do palmito, dentro de cada meio de cultura, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

3.2.2 Diferenciação de embriões somáticos

A permanência dos calos obtidos em meio com baixas concentrações de Picloram (20, 40 e 60 μM) ocasionou o desenvolvimento de um calo com consistência mucilagínosa, que evoluiu para um aglomerado amorfo. Essas formações calogênicas, posteriormente, oxidaram e/ou necrosaram.

3.2.3 Análises anatômicas

Na Figura 16 pode ser verificada a secção transversal do feixe vascular principal de folhas imaturas (palmito) de gueroba, provenientes de cada região testada - proximal, mediana e distal - as quais foram avaliadas quanto a responsividade ao meio de indução de calos. Como descrito anteriormente, o feixe vascular principal, considerado, independentemente da região analisada, a porção mais responsiva das folhas, é colateral, ovóide, formado por um grande cilindro central e traços vasculares isolados, envolvidos por uma camada externa de tecido esclerenquimático (fibras) e uma mais interna de células parenquimáticas. Imediatamente abaixo da epiderme unisseriada, a qual

apresenta estômatos nas faces adaxial e abaxial, verifica-se uma hipoderme bem desenvolvida, com mais de uma camada de células (Figura 16 A, D, G).

Como mencionado no tópico anterior, a formação de calos foi significativamente influenciada pelas formulações salinas do meio e regiões do palmito utilizadas para obtenção dos explantes (Figura 15). De acordo com desdobramento estatístico das regiões dentro de cada formulação salina usada, as três regiões do palmito avaliadas em meio Y3 foram igualmente eficientes na formação de calos, com destaque para as regiões distal (92,7%) e mediana (91,6%). Já, quando inoculados em meio MS, a região distal do palmito exibiu maior percentagem de formação de calos (84,37%) que as demais regiões testadas.

Anatomicamente, algumas diferenças nítidas podem ser observadas entre as regiões foliares extremas do palmito - proximal e distal - essa última considerada a mais responsiva em meio MS. A região proximal exibe feixe vascular central menos diferenciado que o da região distal, principalmente, no que se refere a diferenciação do floema (elementos de tubos crivados e células companheiras), que notoriamente se encontra em intensa divisão celular. Além do mais, possui um maior número de traços vasculares em diferenciação que a região distal, além de uma bainha esclerenquimática formada por células menores, aparentemente em maior quantidade e com maior número de núcleos evidentes (Figura 16G-I). Essas duas regiões também exibem discrepância com relação ao grau de diferenciação das camadas de células da hipoderme, com maior grau de diferenciação, como esperado, na região distal (Figura 16A, D, G). A região mediana apresenta características anatômicas intermediárias entre as regiões proximal e distal, como observado na Figura 16.

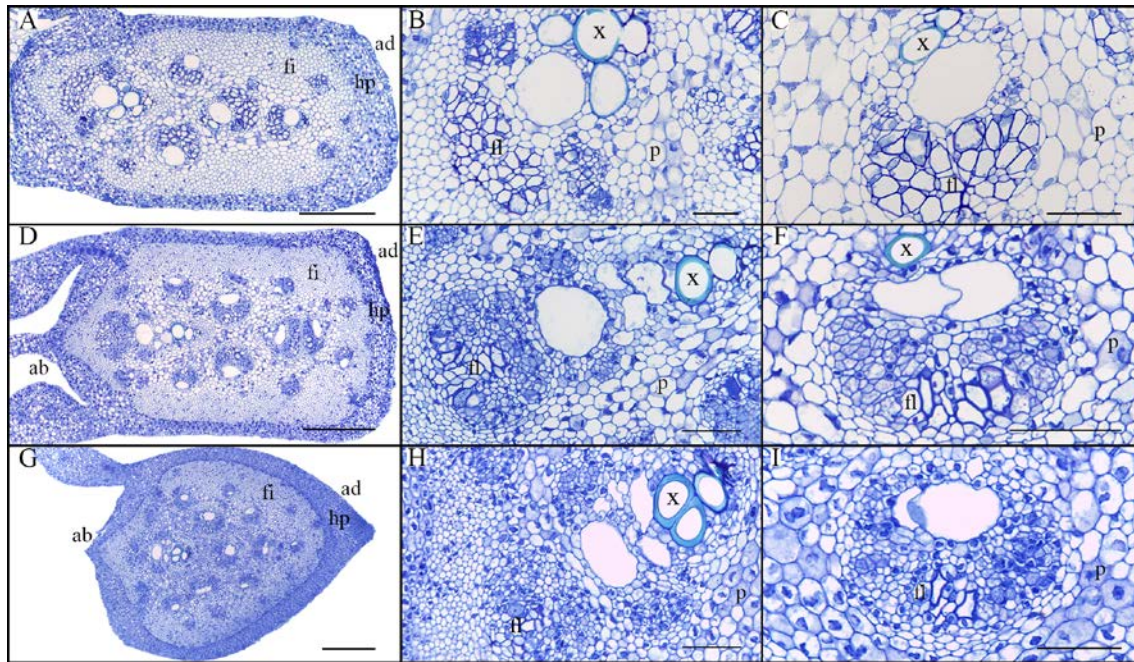


Figura 16. Caracterização anatômica de folhas imaturas originadas de uma planta adulta de guero (*Syagrus oleracea*) utilizada como explantes iniciais na indução de calos visando à embriogênese somática. A: Folha da região distal. B: Nervura central de folha da região distal. C: Nervura secundária (com menor grau de diferenciação) de folha da região distal. D: Folha da região mediana. E: Nervura central de folha da região mediana. F: Nervura secundária (com menor grau de diferenciação) de folha da região mediana. G: Folha de região proximal. H: Nervura central de folha da região proximal. I: Nervura secundária (com menor grau de diferenciação) de folha da região proximal. Abreviações: (ab) face abaxial, (ad) face adaxial, (fi) fibra – células esclerenquimáticas, (fl) floema, (hp) hipoderme, (p) parênquima e (x) xilema. Barras = A, D, G: 200 μm e E, F, H, I: 50 μm .

Histoquimicamente, as três regiões do palmito exibem um padrão similar de distribuição de grãos de amido, os quais são visualizados, principalmente, sobre as células parenquimáticas que circundam os feixes vasculares (Figura 17). Aparentemente, a região proximal exhibe uma quantidade maior de amiloplastos que as demais regiões. A análise histoquímica não detectou corpos proteicos.

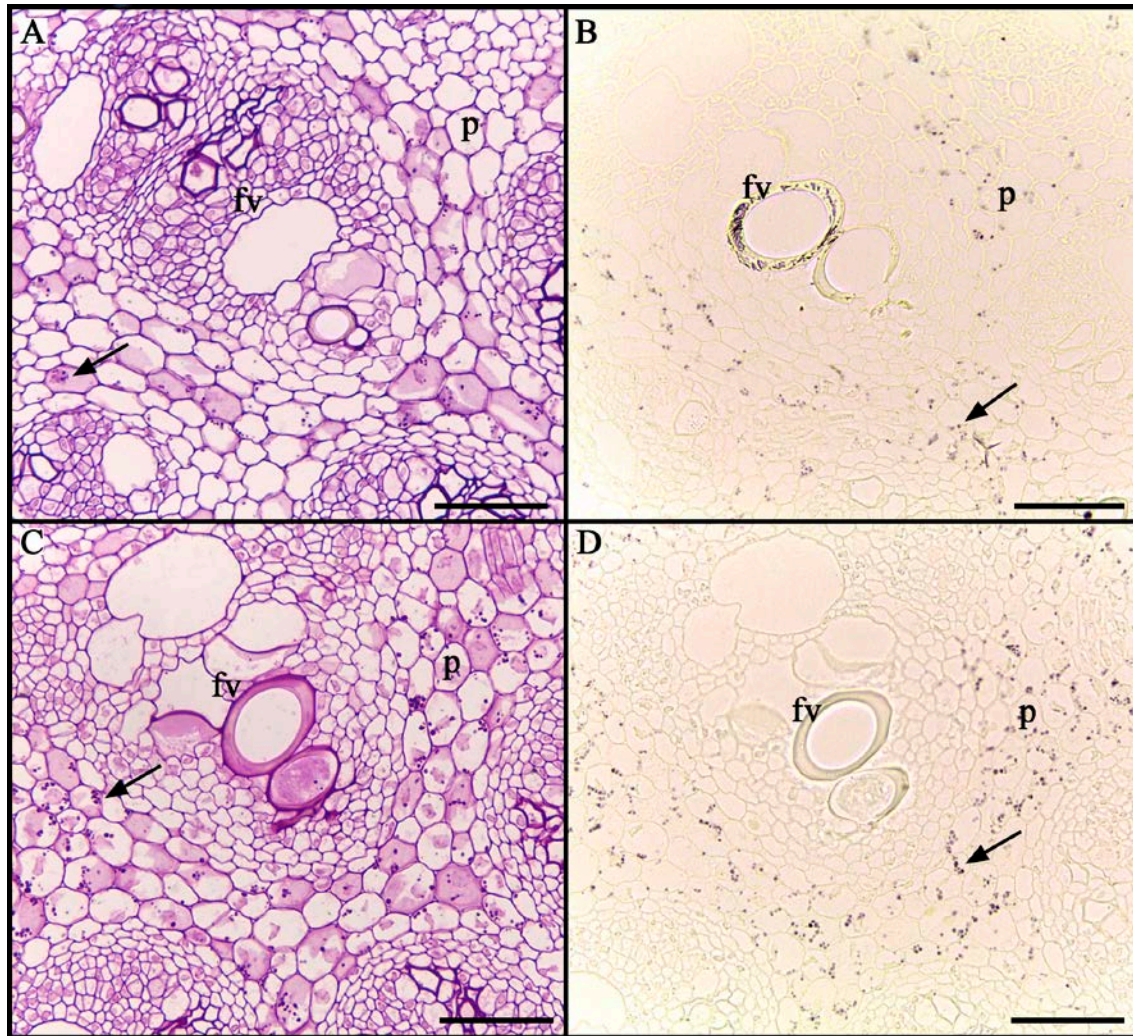


Figura 17. Aspectos histoquímicos de regiões distintas do palmito de gueroaba (*Syagrus oleracea*). A: Polissacarídeos (seta) na região central de folha da região mediana corada com PAS. B: Amiloplastos (grãos de amido - seta) na região central de folha da região mediana corada com Lugol. C: Polissacarídeos (seta) na região central de folha da região proximal corada com PAS. B: Amiloplastos (grãos de amido - seta) na região central de folha da região proximal corada com Lugol. Abreviações: (fv) feixe vascular e (p) parênquima. Barras = A-D: 50 μ m.

Diferentemente do esperado, tecidos foliares insuficientemente diferenciados (região proximal) em meio MS, apresentaram produção sub-ótima de calos, resultado similar ao relatado por Gueye *et al.* (2009a) em *P. dactylifera*, Meira (2015) em *A. aculeata* e Bartos (2016) em *E. guineensis*. Já, Ho e Vasil (1983) verificaram maior atividade de divisão celular em explantes foliares de *Saccharum officinarum* que apresentavam tecidos vasculares com maior grau de diferenciação. Segundo Gueye *et al.* (2009a), as respostas às auxinas exógenas dependem dos níveis endógenos de auxina, da fisiologia inicial e estado de diferenciação dos explantes.

Uma possível explicação é que a região distal, assim como as demais regiões do palmito, é uma região de síntese de auxina endógena (ácido indol-3-acético - AIA) por se tratar de folha jovem (PETRÁŠEK; FRIML, 2009), todavia, a região distal, diferentemente das demais, de acordo com as análises anatômicas, exibe tecidos vasculares, principalmente, floema, mais diferenciados (Figura 16), o que teoricamente proporcionaria maior eficiência no transporte de auxinas (endógena e exógena). Vários são os relatos que consideram o floema como uma das rotas de transporte de auxina endógena (AIA) (BORKOVEC; DIDEHVAR; BAKER, 1994; HOAD, 1995; PETRÁŠEK; FRIML, 2009), inclusive, considerada a mais rápida, o que caracteriza a via de transporte não polar de AIA (GOLDSMITH *et al.*, 1974; CAMBRIDGE; MORRIS, 1996; ALONI, 2004; MORRIS; FRIML; ZAŽÍMALOVÁ, 2004).

O maior aporte de auxina nessa região do palmito (exposição à alta concentração de auxina exógena, associada à provável maior concentração de auxina endógena no floema mais diferenciado) estimularia a formação direta de calos a partir das divisões das *stem cells* – células procambiais pré-existentes nas vizinhanças dos tecidos vasculares e/ou a desdiferenciação de células parenquimáticas (perivasculares e vasculares), o que levaria a formação de calos primários.

Correlação positiva entre altos níveis endógenos de auxina e a iniciação da embriogênese somática tem sido relatada por diferentes autores (FEHÉR; PASTERNAK; DUDITS, 2003; JIMÉNEZ; BANGERTH, 2000; JIMÉNEZ, 2005; AYIL-GUTIÉRREZ *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2013), inclusive em palmeiras como *E. guineensis* (OOI *et al.*, 2012), *P. dactylifera* (GUEYE *et al.*, 2009a) e *B. gasipaes* (NASCIMENTO-GAVIOLI *et al.*, 2017). Conforme Zeng *et al.* (2007), os hormônios endógenos tem maior destaque que os reguladores de crescimento, uma vez que, eles são determinantes para os processos de divisão e diferenciação celular após o processo de indução mediada por reguladores externos.

Dada a relevância do melhor entendimento das respostas iniciais de tecidos somáticos durante o processo de embriogênese somática para a otimização do produto final (quantidade e qualidade de plantas regeneradas), estudos mais detalhados são requeridos, como a identificação da origem celular dos calos e o monitoramento da atividade de auxina endógena (níveis e localização) e sua provável correlação com o potencial calogênico e embriogênico. Tais estudos são essenciais para a elucidação dos mecanismos de aquisição de totipotência em tecidos somáticos de palmeiras, bem como a distinção de células responsivas e não responsivas de forma precoce.

4. CONCLUSÕES

- A formulação salina Y3 suplementada com 450 μ M Picloram é eficiente na produção de calos (volume satisfatório) a partir de tecidos foliares jovens de *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc. (gueroba).
- Explantes foliares oriundos da região distal do palmito de uma planta adulta de *S. oleracea*, de modo geral, exibem um bom desempenho na produção de calos. Portanto, a coleta de explantes de regiões mais próximas do meristema é desnecessária. O uso de porções foliares mais distantes do meristema reduz as chances de danos à planta matriz, inclusive, a morte.
- Explantes oriundos de plantas de *S. oleracea* com diferentes idades (4 e cerca de 10 anos) são semelhantes na produção de calos (calos primários). Todavia, somente aqueles provenientes da planta jovem (4 anos) produzem calos com proembriões.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. La multiplication végétative in vitro du palmier à huile par embryogenèse somatique. **Oléagineux**, v. 36, n. 3, p. 113 - 118, 1981.

AHMAD, I.; HUSSAIN, T.; ASHRAF, I.; NAFEES, M.; MARYAM; RAFAY, M.; IQBAL, M. Lethal effects of secondary metabolites on plant tissue culture. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v. 13, n. 4, p. 539-547, 2013.

ALEMANNINO, L.; BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIÈRE, N. Histology of somatic embryogenesis from floral tissues cocoa. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 46, p. 187-194, 1996.

ALEMANNINO, L.; RAMOS, T.; GARGADENEC, A.; ANDARY, C.; FERRIERE, N. Localization and identification of phenolic compounds in *Theobroma cacao* L. somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, v. 92, n. 4, p. 613-623, 2003.

ALMEIDA, M.; ALMEIDA, C. V. Somatic embryogenesis and in vitro plant regeneration from pejobaye adult plant leaf primordial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n. 41, v. 9, p. 1449-1452, 2006.

ALMEIDA, M.; ALMEIDA, C. V.; GRANER, E. M.; BRONDANI, G. E.; ABREU-TARAZI, M. F. Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study. **Plant Cell Reports**, v. 31, p. 1495-1515, 2012.

ALONI, R. The induction of vascular tissues by auxin. In: DAVIES, P. J. (Ed.). **Plant Hormones - Biosynthesis, Signal Transduction, Action!** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004. p. 471-492.

ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S. Micropropagação da aroeira (*Myracrodouon urundeuva* Fr. All.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.

AVILÉS-VIÑAS, S. A.; LECONA-GUZMÁN, C. A.; CANTO-FLICK, A.; LÓPEZ-EROSA, S.; SANTANA-BUZZY, N. Morpho-histological and ultrastructural study on direct somatic embryogenesis of *Capsicum chinense* Jacq. in liquid medium. **Plant Biotechnology Reports**, v. 7, n. 3, p. 277-286, 2013.

AYIL-GUTIÉRREZ, B.; GALAZ-AVALOS, R. M.; PEÑA-CABRERA, E.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Dynamics of the concentration of IAA and some of its conjugates during the induction of somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. **Plant Signaling & Behavior**, v. 8, n. 11, p. 1-10, 2013.

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.
- BARCIELA, J.; VIEITEZ, A. M. Anatomical sequence and morphometric analysis during somatic embryogenesis on cultured cotyledon explants of *Camellia japonica* L. **Annals of Botany**, v. 71, n. 5, p. 395-404, 1993.
- BARTOS, P. M. C. **Aprimoramento da embriogênese somática de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.), a partir de folhas de plantas adultas: Influência do genótipo e caracterização morfoanatômica e bioquímica**. 2016. 151 p. Tese (Doutorado em Botânica) - Instituto de Ciências Biológicas - IB, Universidade de Brasília, UnB, 2016.
- BENELLI, C.; FABBRI, A.; GRASSI, S.; LAMBARDI, M.; RUGINI, E. Histology of somatic embryogenesis in mature tissues of olive (*Olea europaea* L.). **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 112-119, 2001.
- BHAT, S. R.; CHANDEL, K. P. S. A novel technique to overcome browning in tissue culture. **Plant Cell Reports**, v. 10, 358-361, 1991.
- BORJI, M.; BOUAMAMA-GZARA, B.; CHIBANI, F.; TEYSSIER, C.; AMMAR, A. B.; MLIKI, A.; ZEKRI, S.; GHORBEL, A. Micromorphology, structural and ultrastructural changes during somatic embryogenesis of a Tunisian oat variety (*Avena sativa* L. var 'Meliane'). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, p. 1-14, 2017.
- BORKOVEC, V.; DIDEHVAR, F.; BAKER, D. A. The biosynthesis and translocation of ¹⁴C-IAA in *Ricinus communis*. **Plant Growth Regulation**, v. 15, p. 137-141, 1994.
- BOTTI, C.; VASIL, I. K. Ontogeny of somatic embryos of *Pennisetum americanum*. II. In cultured immature inflorescences. **Canadian Journal of Botany**, v. 62, p. 1629-1635, 1984.
- BUFFARD-MOREL, J.; VERDEIL, J.-L.; PANNETIER, C. Embryogénese somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) à partir d'explants foliaires: étude histologique. **Canadian Journal of Botany**, v. 70, p. 735-741, 1992.
- CAMBRIDGE, A. P.; MORRIS, D. A. Transfer of exogenous auxin from the phloem to the polar auxin transport pathway in pea (*Pisum sativum* L.). **Planta**, v. 199, p. 583-588, 1996.
- CAMPBELL, L.; TURNER, S. Regulation of vascular cell division. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 1, p. 27-43, 2017.
- CANHOTO, J. M.; CRUZ, G. S. Histodifferentiation of somatic embryos in cotyledons of pineapple guava (*Feijoa sellowiana* Berg). **Protoplasma**, v. 191, p. 34-45, 1996.
- CANHOTO, J. M.; MESQUITA, J. F.; CRUZ, G. S. Ultrastructural changes in cotyledons of pineapple guava (Myrtaceae) during somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, v. 78, p. 513-521, 1996.

- CARVALHO, M. A. F.; PAIVA, R.; ALVES, E.; NOGUEIRA, R. C.; STEIN, V. C.; CASTRO, E. M.; PAIVA, P. D. O.; VARGAS, D. P. Morphogenetic potential of native passion fruit (*Passiflora gibertii* N. E. Brown.) calli. **Brazilian Journal of Botany**, v. 36, p. 141-151, 2013.
- CHAN, J. L.; SAÉNZ, L.; TALAVERA, C.; HORNUNG, R.; ROBERT, M.; OROPEZA, C. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 515-521, 1998.
- CONSTANTIN, M.; NCHU, W. A.; GODSWILL, N.-N.; WIENDI, N. M. A.; WACHJAR, A.; FRANK, N. E. G. Induction of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Tenera) callogenesis and somatic embryogenesis from young leaf explants. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 4-10, 2015.
- CORRÊA, T. R.; MOTOIKE, S. Y.; ANDRADE, A. P. S.; COSER, S. M.; QUEIROZ, V.; GRANJA, M. M. C.; CAETANO, D. D. N.; PEÑA, C. N. M.; PICOLI, E. A. T. Accelerated *in vitro* propagation of elite oil palm genotypes (*Elaeis guineensis* Jacq.) by substituting cytokinin with putrescine. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 50, p. 2767-2775, 2016.
- CURRIER, H. B. Callose substances in plant cells. **American Journal of Botany**, v. 44, n. 6, pp. 478-488, 1957.
- DIAS, J. E. **Cadeia produtiva do óleo de gueroaba (*Syagrus oleracea* Becc.): geração de renda para agricultores familiares e promoção da agrobiodiversidade, Buriti de Goiás (GO)**. 2012. 136p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2012.
- DINIZ, J. A.; SÁ, L. F. **A cultura da guariroba**. Goiânia: EMATER-GO, 1995. 16 p. (Boletim Técnico, 3).
- DUBOIS, T. M.; GUEDIRA, J.; DUBOIS, J.; VASSEUR, J. Direct somatic embryogenesis in roots of *Cichorium*: as callose an early marker? **Annals of Botany**, v. 65, p. 539-545, 1990.
- DUDITS, D.; GYÖRGYÉY, J.; BÖGRE, L.; BAKO, L. **Molecular biology of somatic embryogenesis**. In: THORPE, T. A. (Ed.). *In vitro* Embryogenesis in Plants. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 267-308.
- DUVAL, Y.; ENGELMANN, F.; DURAND-GASSELIN, T. Somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry: Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed**. Berlin: Springer - Verlag. 1995. p. 335-352.
- EEUWENS, C. J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants Excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v. 36, p. 23-28, 1976.
- EKE, C. R.; AKOMEAH, P.; ASEMOTA, O. Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) from apical meristem tissues from 'zebia' and 'loko' landraces. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 244-246, 2005.

EL BAR, O. H. A.; EL DAWAYATI, M. M. Histological changes on regeneration *in vitro* culture of date palm (*Phoenix dactylifera*) leaf explants. **Australian Journal of Crop Science**, v. 8, n. 6, p. 848-855, 2014.

ESCHRICH, W.; CURRIER, H. B. Identification of callose by its diachrome and fluorochrome reactions. **Stain Technology**, v. 39, p. 303-307, 1964.

ESHRAHGI, P.; ZARGHAMI, R.; MIRABDULBAGHI, M. Somatic embryogenesis in two Iranian date palm cultivars. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 1309-1312, 2005.

FEHÉR, A. Somatic embryogenesis – stress-induced remodeling of plant cell fate. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1849, n. 4, p. 385-402, 2015.

FEHÉR, A. Why somatic plant cells start to form embryos? In: MUJIB, S.; SAMAJ, J. (Eds.). **Somatic embryogenesis**. Heidelberg: Plant Cell Monographs, Springer, 2006. p. 85-101.

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

FERNANDO, S. C.; VERDEIL, J. L.; HOCHER, V.; WEERAKOON, L. K.; HIRIMBUREGAMA, K. Histological analysis of plant regeneration from plumule explants of *Cocos nucifera*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 72, p. 281-284, 2003.

FRANSZ, P. F.; SCHEL, J. H. N. An ultrastructural study on the early development of *Zea mays* somatic embryos. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, p. 858-865, 1991.

FUKUDA, H. Signals that control plant vascular cell differentiation. **Nature Reviews, Molecular Cell Biology**, v. 5, 379-391, 2004.

GLASSMAN, S. F. Systematic studies in the leaf anatomy of palm genus *Syagrus*. **American Journal of Botany**, v. 59, n. 8, p. 775-788, 1972.

GOH, D. K. S.; BON, 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, p. 375-381, 2001.

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, p. 424-427, 1999.

GOLDSMITH, M. H. M.; CATALDO, D. A.; KARN, J.; BRENNEMAN, T.; TRIP, P. The rapid non-polar transport of auxin in the phloem of intact *Coleus* plants. **Planta**, v. 116, p. 301-317, 1974.

GOMES, H. T.; BARTOS, P. M. C.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. 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**, p. 1-14, 2017.

GRAPIN, A.; SCHWENDIMAN, J.; TEISSON, C. Somatic embryogenesis in plantain banana. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 32, p. 66-71, 1996.

GUEDES, R. S.; SILVA, T. L.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. N. Initial requirements for embryogenic calluses initiation in thin cell layers explants from immature female oil palm inflorescences. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 52, p. 10774-10780, 2011.

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

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

GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis in tissue cultures of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). In: AHUJA, M. R. (Ed.). **Woody Plant Biotechnology**. New York: Plenum Press, 1991. p. 189-196.

GUEYE, B.; MORCILLO, F.; COLLIN, M.; GARGANI, D.; OVERVOORDE, P.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; VERDEIL, J. L. Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2,4-D treatment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 99, p. 35-45, 2009a.

GUEYE, B.; SAÏD-AHMED, H.; MORCILLO, F.; BORGEL, A.; SANE, D.; HILBERT, J.-L.; VERDEIL, J.-L.; BLERVACQ, A.-S. Callogenesis and rhizogenesis in date palm leaf segments: are there similarities between the two auxin-induced. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 98, p. 47-58, 2009b.

GUZZO, F.; BALDAN, B.; MARIANI, P.; LO SCHIAVO, F.; TERZI, M. Studies on the origin of totipotent cells in explants of *Daucus carota* L. **Journal of Experimental Botany**, v. 45, n. 279, p. 1427-1432, 1994.

HALPERIN, W.; JENSEN, W. A. Ultrastructural changes during growth and embryogenesis in carrot cell cultures. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 18, p. 428-443, 1967.

HE, X-Q.; QU, L.-J. Cellular and molecular features of the procambium and cambium in plant vascular tissue development. In: ROSE, R. J. (Ed.). **Molecular cell biology of the growth and differentiation of plant cells**. Boca Raton: CRC Press, 2016. p. 236 - 256.

HIANE, P. A.; SILVA, V. C. F.; RAMOS FILHO, M. M.; RAMOS, M. I. L.; CAMPOS, R. P. Caracterização química do palmito guariroba *in natura* e congelado. **Ciência Rural**, v. 41, n. 6, p.1082-1087, 2011.

HO, W.-J.; VASIL, I. K. Somatic Embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) I. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. **Protoplasma**, v. 118, p. 69-180, 1983.

HOAD, G. V. Transport of hormones in the phloem of higher plants. **Plant Growth Regulation**, v. 16, p. 173-182, 1995.

JAYANTHI, M.; SUSANTHI, B.; NANDIGANTI, M. M.; MANDAL, P. K. *In vitro* somatic embryogenesis and plantlet regeneration from immature male inflorescence of adult dura and tenera palms of *Elaeis guineensis* (Jacq.). **SpringerPlus**, v. 4, n. 256, p. 1-7, 2015.

JIANG, F.; FENG, Z.; LIU, H.; ZHU, J. Involvement of plant stem cells or stem cell-like cells in dedifferentiation. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 1028, p. 1-6, 2015.

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

JIMÉNEZ, V. M.; BANGERTH, F. Relationship between endogenous hormone levels of grapevine callus cultures and their morphogenetic behavior. **Vitis**, v. 39, n. 4, p. 151-157, 2000.

JIN, F. Y.; HU, L. S.; YUAN, D. J.; XU, J.; GAO, W. H.; HE, L. R.; YANG, X. Y.; ZHANG, X. L. Comparative transcriptome analysis between somatic embryos (SEs) and zygotic embryos in cotton: evidence for stress response functions in SE development. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, p. 161-173, 2014.

JOHANSEN, D. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill, 523 p. 1940.

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.

JONG, A. J.; CORDEWENER, J.; THOMAS, F.; TERZI, M.; VANDEKERCKHOVE, J.; KAMMEN, A. V.; VRIES, S. C. A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. **The Plant Cell**, v. 4, p. 425-433, 1992.

KARAMI, O.; SAID, A. The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. **Molecular Biology Reports**, v. 37, p. 2493-2507, 2010.

KARNOVSKY, M. J. A. formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137-138, 1965.

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, p. 1623-1628, 2004.

KONAR, R. N.; THOMAS, E.; STREET, H. E. Origin and structure of embryoids arising from epidermal cells of the stem of *Ranunculus sceleratus* L. **Journal of Cell Science**, p. 77-93, 1972.

KOUAKOU, T. H.; WAFFO-TÉGUO, P.; KOUADIO, Y. J.; VALLS, J.; RICHARD, T.; DECENDIT, A.; MÉRILLON, J.-M. Phenolic compounds and somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 90, p. 25-29, 2007.

KURUP, S. S.; ALY, M. A. M.; LEKSHMI, G.; TAWFIK, N. H. Rapid *in vitro* regeneration of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Kheneizi using tender leaf explant. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 26, n. 6, p. 539-544, 2014.

KWAAITAAL, M. A. C. J.; VRIES, S. C. The SERK1 gene expressed in procambium and immature vascular cells. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 11, p. 2887-2896, 2007.

LAKSHMANAN, P.; TAJI, A. Somatic embryogenesis in leguminous plants. **Plant Biology**, v. 2, p. 136-148, 2000.

LAUKKANEN, H.; HÄGGMAN, H.; KONTUNEN-SOPPELA; HOHTOLA, A. Tissue browning of *in vitro* cultures of Scots pine: Role of peroxidase and polyphenol oxidase. **Physiologia Plantarum**, v. 106, p. 337-343, 1999.

LEDO, A. S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K.; de 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, p. 601-603, 2002.

LELJAK-LEVANIĆ, D.; MIHALJEVIC, S.; BAUER, N. Somatic and zygotic embryos share common developmental features at the onset of plant embryogenesis. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, n. 127, p. 1-14, 2015.

LIU, J.; SHENG, L.; XU, Y.; LI, J.; YANG, Z.; HUANG, H.; XU, L. 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**, v. 26, n. 3, p. 1081-1093, 2014.

LU, C. Y.; VASIL, I. K. Histology of somatic embryogenesis in *Panicum maximum* (Guinea grass). **American Journal of Botany**, v. 72, p. 1908-1913, 1985.

LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. An improved protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from mature zygotic embryos. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 118, p. 485-496, 2014.

MATSUOKA, H.; HINATA, K. NAA-induced organogenesis and embryogenesis in hypocotyl callus of *Solanum melongena* L. **Journal of Experimental Botany**, v. 30, p. 363-370, 1979.

MATTHYS-ROCHON, E. Secreted molecules and their role in embryo formation in plants: a mini-review. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, v. 47, n. 1, p. 23-29, 2005.

MEIRA, F. S. Embriogênese somática em macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) a partir de tecidos foliares de plantas adultas. 2015. 75 p.

Dissertação (Mestrado em Botânica) - Instituto de Ciências Biológicas - IB, Universidade de Brasília, UnB, 2015.

MICHAUX-FERRIÈRE, N.; GROUT, H.; CARRON, M. P. Origin and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae). **American Journal of Botany**, v. 79, n. 2, p. 174-180, 1992.

MIKULA, A.; TYKARSKA, T.; ZIELINSKA, M.; KURAS, M.; RYBCZYNSKI, J. J. Ultrastructural changes in zygotic embryos of *Gentiana punctata* L. during callus formation and somatic embryogenesis. **Acta Biologica Cracoviensia**, v. 46, p. 109-120, 2004.

MORRIS, D. A.; FRIML, J.; ZAŽÍMALOVÁ, E. The functioning of hormones in plant growth and development. In: DAVIES, P. J. (Ed.). **Plant Hormones - Biosynthesis, Signal Transduction, Action!** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004. p. 437-470.

MOTOIKE, S. Y.; SARAIVA, E. A.; VENTRELLA, M. C.; SILVA, C. V.; SALOMÃO, L. C. C. Somatic embryogenesis of *Myrciaria aureana* (Brazilian grape tree). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 89, p. 75-81, 2007.

MOURA, E. F.; VENTRELLA, M. C.; MOTOIKE, S. Y.; DE SÁ JUNIOR, 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, 175-184, 2008.

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

NA, H.; KIM, K. W.; KWACK, Y.; KIM, S. K.; CHUN, C. Comparative anatomy of embryogenic and non-embryogenic calli from *Pimpinella brachycarpa*. **Journal of Plant Biology**, v. 50, n. 3, p. 344-350, 2007.

NASCIMENTO-GAVIOLI, M. C. A.; CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; STEINMACHER, D.; REE, J. F.; STEINER, N.; GUERRA, M. P. Physiological and biochemical features of embryogenic and non-embryogenic peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) cultures. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, p. 1-8, 2017.

NAZ, S.; ALI, A.; IQBAL, J. Phenolic content *in vitro* cultures of chick pea (*Cicer arietinum* L.) during callogenesis and organogenesis. **Pakistan Journal of Botany**, v. 40, n. 6, p. 2525-2539, 2008.

NEUENSCHWANDER, B.; BAUMANN, T. W. A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. **Plant Cell Reports**, v. 10, p. 608-612, 1992.

NGUYEN, Q. T.; BANDUPRIYA, H. D. D.; LOPEZ-VILLALOBOS, A.; SISUNANDAR, S.; FOALE, M.; ADKINS, S. W. Tissue culture and associated biotechnological interventions for the improvement of coconut (*Cocos nucifera* L.): a review. **Planta**, v. 242, p. 1059-1076, 2015.

NIC-CAN, G. I.; AVILEZ-MONTALVO, J. R.; AVILES-MONTALVO, R. N.; MÁRQUEZ-LÓPEZ, R. E.; MELLADO-MOJICA, E.; GALAZ-ÁVALOS, R. M.; LOYOLA-VARGAS, V. M. The relationship between stress and somatic embryogenesis. In: LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. (Eds.). **Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications**. Springer: Switzerland, 2016. p. 151-170.

NIC-CAN, G. I.; GALAZ-ÁVALOS, R. M.; DE-LA-PEÑA, C.; ALCAZAR-MAGAÑA, A.; WROBEL, K.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Somatic embryogenesis: identified factors that lead to embryogenic repression. A case of species of the same genus. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1-21, 2015.

NORTH, J. J.; NDAKIDEMI, P. A.; LAUBSCHER, C. P. Effects of antioxidants, plant growth regulators and wounding on phenolic compound excretion during micropropagation of *Strelitzia reginae*. **International Journal of the Physical Sciences**, v. 7, n. 4, p. 638-646, 2012.

NOWAK, K.; GAJ, M. D. Stress-related function of bHLH109 in somatic embryo induction in *Arabidopsis*. **Journal of Plant Physiology**, v. 193, p. 119-126, 2016.

O'BRIEN T. P.; MCCYLLY, M. E. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Melbourne: Termarcarphi PTY. LTD, 1981.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCYLLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, p. 368-373, 1964.

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. Morpho-histological, histochemical, and molecular evidences related to cellular reprogramming during somatic embryogenesis of the model grass *Brachypodium distachyon*. **Protoplasma**, p. 1-18, 2017.

OOI, S.-E.; CHOO, C.-N.; ISHAK, Z.; ONG-ABDULLAH, M. A candidate auxin-responsive expression marker gene, EgIAA9, for somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 110, p. 201-212, 2012.

PÁDUA, M. S.; PAIVA, L. V.; LABORY, C. R. G.; ALVES, E.; STEIN, V. C. Induction and characterization of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) pro-embryogenic masses. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 4, p. 1545-1556, 2013.

PAN, X.; YANG, X.; LIN, G.; ZOU, R.; CHEN, H.; SAMAJ, J.; XU, C. Ultrastructural changes and the distribution of arabinogalactan proteins during somatic embryogenesis of banana (*Musa* spp. AAA cv. 'Yueyoukang 1'). **Physiologia Plantarum**, v. 142, p. 372-389, 2011.

PANNETIER, C.; BUFFARD-MOREL. J. Production of somatic embryos from leaf tissues of coconut, *Cocos nucifera* L. **Plant Tissue Culture**, p. 755-756, 1982.

PEDROSO, M. C.; PAIS, M. S. A scanning electron microscopy and X ray microanalysis study during induction of morphogenesis in *Camellia japonica* L. **Plant Science**, v. 87, p. 99-108, 1992.

PERERA, P. I. P.; YAKANDAWALA, D. M. D.; HOCHER, V.; VERDEIL, J.-L.; WEERAKOON, L. K. Effect of growth regulators on microspore embryogenesis in coconut anthers. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 96, p. 171-180, 2009.

PÉREZ-NÚÑEZ, M. T.; CHAN, J. L.; SÁENZ, L.; GONZÁLEZ, 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.

PETRÁŠEK, J.; FRIML, J. Auxin transport routes in plant development. **Development**, v. 136, p. 2675-2688, 2009.

PLATA, E.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, A. M. An anatomical study of secondary embryogenesis in *Camellia reticulata*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 27, p. 183-189, 1991.

PUIGDERRAJOLS, P.; MIR, G.; MOLINAS, M. Ultrastructure of early secondary embryogenesis by multicellular and unicellular pathways in cork oak (*Quercus suber* L.). **Annals of Botany**, v. 87, p. 179-189, 2001.

QUIROZ-FIGUEROA, F. R.; FUENTES-CERDA, C. F. J.; ROJAS-HERRERA, R.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 1141-1149, 2002.

R CORE TEAM (2015). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em: 28 jan 2015.

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, E.; BATISTA, M. T.; CANHOTO, J. M. Effect and analysis of phenolic compounds during somatic embryogenesis induction in *Feijoa sellowiana* Berg. **Protoplasma**, v. 232, p. 193-202, 2008.

ROCHA, D. I. R.; PINTO, D. L. P.; VIEIRA, L. M.; TANAKA, F. A. O.; DORNELAS, M. C.; OTONI, W. C. Cellular and molecular changes associated with competence acquisition during passion fruit somatic embryogenesis: ultrastructural characterization and analysis of SERK gene expression. **Protoplasma**, v. 253, n. 2, p. 595-609, 2016.

ROCHA, D. I.; VIEIRA, L. M.; TANAKA, F. A. O.; SILVA, L. C.; OTONI, W. C. Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. **Protoplasma**, v. 249, p. 747-758, 2012.

RODRIGUEZ, A. P. M.; WETZSTEIN, H. Y. A morphological and histological comparison of the initiation and development of pecan (*Carya illinoensis*) somatic

embryogenic cultures induced with naphthaleneacetic acid or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Protoplasma**, v. 204, p. 71-83, 1998.

RONCHI, V. N.; GIORGEITI, L. The Cell's Commitment to Somatic Embryogenesis. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry: Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed**. Berlin: Springer – Verlag, 1995. p. 3-19.

ROSE, R. J. Genetic reprogramming of plant cells in vitro via dedifferentiation or pre-existing stem cells. In: ROSE, R. J. (Ed.). **Molecular cell biology of the growth and differentiation of plant cells**. Boca Raton: CRC Press, 2016. p. 320-339.

ROSE, R. J.; WANG, X. D.; NOLAN, K. E.; ROLFE, B. G. Root meristems in *Medicago truncatula* tissue culture arise from vascular-derived procambial-like cells in a process regulated by ethylene. **Journal of Experimental Botany**, v.57, n. 10, p. 2227-2235, 2006.

SAMAJ, J.; BALUSKA, F.; BOBÁK, M.; VOLKMANN, D. Extracellular matrix surface network of embryogenic units of friable maize callus contains arabinogalactan-proteins recognized by monoclonal antibody JIM4. **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 369-374, 1999.

SANDOVAL-CANCINO, G.; SÁENZ, L.; CHAN, J. L.; OROPEZA, C. Improved formation of embryogenic callus from coconut immature inflorescence explants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 52, n. 4, p. 367-378, 2016.

SANÉ, D.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; GASSAMA-DIA, Y. K.; SAGNA, M.; TROUSLOT, M. F.; DUVAL, Y.; BORGEL, A. Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). **Annals of Botany**, v. 98, p. 301-308, 2006.

SAN-JOSÉ, M. C.; CORREDOIRA, E.; MARTÍNEZ, M. T.; VIDAL, N.; VALLADARES, S.; MALLÓN, R.; VIEITEZ, A. M. Shoot apex explants for induction of somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* L. trees. **Plant Cell Reports**, v. 29, p. 661-671, 2010.

SANTANA-BUZZY, N.; LÓPEZ-PUC, G.; CANTO-FLICK, A.; BARREDO-POOL, F.; BALAM-UC, E.; AVILÉS-VIÑAS, S.; SOLÍS-MARROQUÍN, D.; LECONA-GUZMÁN, C.; BELLO-BELLO, J. J.; GÓMEZ-UC, E.; MIJANGOS-CORTÉS, J. O. Ontogenesis of the somatic embryogenesis of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). **Hortscience**, v. 44, n. 1, p. 113-118, 2009.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; DA GUEDES, R. S.; FERMINO JR., P. C. P.; SILVA, T. L.; COSTA, F. H. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 46, p. 378-385, 2010.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; GUEDES, R. S.; DA 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.

SCHMIDT, E. D. L.; GUZZO, F.; TOONEN, M. A. J.; VRIES, S. C. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. **Development**, v. 124, p. 2049-2062, 1997.

SCHUMANN, G.; RYSCHKA, U.; SCHULZE, J.; KLOCKEL, E. Anatomy of Somatic Embryogenesis. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry: Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed**. Berlin: Springer – Verlag, 1995. p. 71-86.

SCHWENDIMAN, J.; PANNETIER, C.; N. MICHAUX-FERRIERE Histology of Somatic Embryogenesis from Leaf Explants of the Oil Palm *Elaeis guineensis*. **Annals of Botany**, v.62, n. 1, p.43-52, 1988.

SILVA, G. M.; CRUZ, A. C. F.; OTONI, W. C.; PEREIRA, T. N. S.; ROCHA, D. I.; SILVA, M. L. Histochemical evaluation of induction of somatic embryogenesis in *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 51, n. 5, p. 539-545, 2015.

SILVA, R. C.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. The histodifferentiation events involved during the acquisition and development of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Growth Regulation**, v. 72, p. 67-80, 2014.

SILVA, R. C.; LUIS, Z. L.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Differential responses to somatic embryogenesis of different genotypes of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 111, p. 59-67, 2012.

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

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, p. 15-22, 2007.

STEINMACHER, D. A.; GUERRA, M. P.; SAARE-SURMINSKI, K.; LIEBEREI, R. A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, v. 108, n. 8, p. 1463-1475, 2011.

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, morphohistological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation. **Annals of Botany**, v. 100, p. 699-709, 2007b.

SZYRAJEW, K.; BIELEWICZ, D.; DOLATA, J.; WÓJCIK, A. M.; NOWAK, K.; SZCZYGIEL-SOMMER, A.; SZWEYKOWSKA-KULINSKA, Z.; JARMOLOWSKI, A.; GAJ, M. D. MicroRNAs Are Intensively Regulated during Induction of Somatic Embryogenesis in Arabidopsis. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. 18, p. 1-16, 2017.

TARRÉ, E.; MAGIOLI, C.; MARGIS-PINHEIRO, M.; SACHETTO-MARTINS, G.; MANSUR, E.; SANTIAGO-FERNANDES, L. D. R. *In vitro* somatic embryogenesis and adventitious root initiation have a common origin in eggplant (*Solanum melongena* L.). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 1, p. 79-84, 2004.

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

TEIXEIRA, J. B.; SÖNDAHL, M. R.; NAKAMURA, T.; KIRBY, E. G. Establishment of oil palm cell suspensions and plant regeneration. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 40, p. 105-111, 1995.

THOMAS, E.; KONAR, R. N.; STREET, H. E. The fine structure of the embryogenic callus of *Ranunculus sceleratus* L. **Journal of Cell Science**, v. 2, p. 95-109, 1972.

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, p. 149-15, 1987.

VASIL, V.; VASIL, I. K. The ontogeny of somatic embryos of *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. I. in cultured immature embryos. **Botanical Gazette**, v. 143, n. 4, p. 454-465, 1982.

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

VERDEIL, J. L.; HOCHER, V.; HUET, C.; GROSDÉMANGE, F.; ESCOUTE, J.; FERRIERE, N.; NICOLE, M. Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence. **Annals of Botany**, v. 88, p. 9-18, 2001.

VERDUS, M.-C.; DUBOIS, T.; DUBOIS, J.; VASSEUR, J. Ultrastructural changes in leaves of *Cichorium* during somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, v. 72, p. 375-383, 1993.

VIDAL, B. C. Dichroism in collagen bundles stained with xylydine-Ponceau 2R. **Annales d'Histochemie**, v. 15, p. 289-296, 1970.

VIEITEZ, A. M. Somatic embryogenesis in *Camellia* spp. In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWTON, R. J. (Eds.). **Somatic embryogenesis in woody plants. Volume 2 – Angiosperms**. Dordrecht: Springer, 1995. p. 358-375.

VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHOKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 233-249. 2002.

VRIES, S. C.; BOOIJ, H.; MEYERINK, P.; HUISMAN, G.; WILDE, H. D.; THOMAS, T. L.; VAN KAMMEN, A. Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension cultures. **Planta**, v. 176, p. 196-204, 1988.

WANG, H. C.; CHEN, J. T.; WU, S. P.; LIN, M. C.; CHANG, W. C. Plant regeneration through somatic embryogenesis from zygotic embryo-derived callus of *Areca catechu* L. (Arecaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 39, p. 34-36, 2003.

WANG, X.; SHI, L.; LIN, G.; PAN, X.; CHEN, H.; WU, X.; TAKÁČ, T.; SAMAJ, J.; XU, C. A systematic comparison of embryogenic and non-embryogenic cells of banana (*Musa* spp. AAA): Ultrastructural, biochemical and cell wall component analyses. **Scientia Horticulturae**, v. 159, p. 178-185, 2013.

WANG, X.-D.; NOLAN, K. E.; IRWANTO, R. R.; SHEAHAN, M. B.; ROSE, R. J. Ontogeny of embryogenic callus in *Medicago truncatula*: the fate of the pluripotent and totipotent stem cells. **Annals of Botany**, v. 107, p. 599-609, 2011.

WIENDI, N. M. A.; CONSTANTIN, M.; WACHYAR, A. Study of Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) *In Vitro* Embryogenesis using Young Leaf Explants. **Journal of Tropical Crop Science**, v. 2, n. 2, p. 5-9, 2015.

WILLIAMS, E. S.; MAHESWARAN, B. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, v. 57, p. 443-462, 1986.

YANG, L.; BIAN, L.; SHEN, H.; LI, T. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from mature zygotic embryos of Manchurian ash (*Fraxinus mandshurica* Rupr.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 115, n. 2, p. 115-125, 2013.

YEUNG, E. C. **Structural and development patterns in somatic embryogenesis**. In: THORPE, T. A. (Ed). *In vitro* Embryogenesis in Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1995, p. 205-248.

YOU, X. L.; YI, J. S.; CHOI, Y. E. Cellular change and callose accumulation in zygotic embryos of *Eleutherococcus senticosus* caused by plasmolyzing pretreatment result in high frequency of single-cell-derived somatic embryogenesis. **Protoplasma**, v. 227, p. 105-112, 2006.

YUSNITA; HAPSORO, D. *In vitro* callus induction and embryogenesis of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from leaf explants. **Hayati Journal of Biosciences**, v. 18, n. 2, p. 61-65, 2011.

YUSOFF, N. F. M.; ALWEE, S. S. R. S.; ABDULLAH, M. O.; CHAI-LING, H.; NAMASIVAYAM, P. A time course anatomical analysis of callogenesis from young leaf explants of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Journal of Oil Palm Research**, v. 24, p. 1330-1341, 2012.

ZAVALIEV, R.; UEKI, S.; EPEL, B. L.; CITOVSKEY, V. Biology of callose (β -1,3-glucan) turnover at plasmodesmata. **Protoplasma**, v. 248, p. 117-130, 2011.

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, 1-9, 2010.

ZENG, F.; ZHANG, X.; JIN, S.; CHENG, L.; LIANG, S.; HU, L.; GUO, X.; NIE, Y.; CAO, J Chromatin reorganization and endogenous auxin/cytokinin dynamic activity during somatic embryogenesis of cultured cotton cell. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 90, p. 63-70, 2007.

CAPÍTULO V

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE GUEROBA [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] A PARTIR DE INFLORESCÊNCIAS

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE GUEROBA [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] A PARTIR DE INFLORESCÊNCIAS

RESUMO

O estudo em questão teve como objetivo desenvolver um protocolo de embriogênese somática e de consequente regeneração de plantas de gueroba (*Syagrus oleracea* Mart. Becc.) partindo-se de inflorescências imaturas, além de investigar os eventos iniciais da calogênese a partir de flores maduras da espécie. Eventos anatômicos e histoquímicos subjacentes aos processos também foram analisados. Para as inflorescências imaturas, avaliou-se o efeito de diferentes auxinas, concentrações e estádios de maturidade dos explantes. Em um primeiro experimento, investigou-se a influência na indução de calos, formação de embriões somáticos e regeneração de plantas das auxinas ácido 4-amino-3, 5, 6-tricloropicolínico (Picloram) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) em baixa concentração (4,52 μM) em meio de MS sem carvão ativado. Em um segundo experimento, avaliou-se a influência das auxinas supracitadas em quatro diferentes concentrações (0, 225, 450 e 675 μM), em meio de MS com 2,5 g.L^{-1} de carvão ativado, além da influência dos diferentes graus de maturidade das inflorescências, classificadas com base no comprimento das espatas (estádio I – 6-17 cm, estágio II – 21,5-35 cm e estágio III – 41,5 cm). Já para flores maduras, a influência na indução de calos foi testada em três tipos de explantes (flor pistilada fechada, flor pistilada seccionada longitudinalmente e carpelo seccionado longitudinalmente), inoculados em meio de MS com 450 μM de Picloram. Para diferenciação de embriões somáticos, as concentrações das auxinas utilizadas nos três experimentos foram gradativamente reduzidas. Para regeneração de plantas, os embriões somáticos obtidos no primeiro experimento foram inoculados em meio desprovido de regulador de crescimento e acrescido de 2,5 g.L^{-1} de carvão ativado, enquanto que, aqueles provenientes do segundo experimento foram inoculados em $\frac{1}{2}$ de MS, também sem regulador de crescimento, com 1,5 g.L^{-1} de carvão ativado. Verificou-se que a auxina Picloram foi mais eficiente que 2,4-D para a indução de calos e formação de embriões somáticos, a partir de inflorescências imaturas. Tecidos imaturos (estádio I) provenientes de inflorescências necessariamente não são mais responsivos em termos de desdiferenciação e consequente formação de calos que tecidos menos imaturos (estádio II e III), porém, são mais embriogênicos do que estes. O processo de embriogênese somática foi relativamente lento, assincrônico e marcado por anormalidades, como fusão dos embriões somáticos obtidos. Hipotetiza-se que a regeneração foi limitada em função da ocorrência de fusionamento e de germinação precoce (emissão de raiz), o que realça a necessidade da otimização futura da fase de maturação. As análises anatômicas confirmam a organização bipolar dos embriões somáticos, com meristemas caulinar e radicular, além de ausência de conexão vascular com o explante de origem. As análises histológicas sugerem origem multicelular dos embriões e evidenciam similaridades com embriões zigóticos da espécie. Quanto às flores maduras, calos embriogênicos foram observados somente a partir de flores pistiladas seccionadas longitudinalmente. Esses explantes portam-se como fonte alternativa à embriogênese somática de gueroba, apesar do maior grau de diferenciação dos tecidos.

Palavras-chaves: Palmeira; inflorescência; flores; auxinas; calogênese; embriões somáticos.

SOMATIC EMBRYOGENESIS AND PLANT REGENERATION IN GUEROBA [*Syagrus oleracea* (MART.) BECC.] FROM INFLORESCENCES

ABSTRACT

The objective of this study was to develop a protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration of gueroaba (*Syagrus oleracea* Mart. Becc.) from immature inflorescences, besides investigating the initial events of callogenesis from mature flowers of the species. Anatomical and histochemical events underlying the processes were also analyzed. For immature inflorescences, the effect of different auxins, concentrations and stages of explants maturity were evaluated. In a first experiment, the influence of calli induction, somatic embryos formation and plant regeneration was investigated from auxins 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid (Picloram) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) at low concentration (4.52 μM) in an MS medium without activated charcoal. In a second experiment, the influence of the mentioned auxins was evaluated in four concentrations (0, 225, 450 and 675 μM) in MS medium, besides the influence of different stages of inflorescences maturity, based on the spaths length (stage I – 6-17 cm, stage II – 21.5-35 cm and stage III - 41.5 cm) were evaluated. For mature flowers, the calli induction WAS tested from three different explant types (closed pistillate flower; pistillate flower longitudinally sectioned and carpel longitudinally sectioned), wich were inoculated in an MS medium with 450 μM picloram with 2.5 g.L^{-1} activated charcoal. For somatic embryos differentiation, the auxins concentrations used in the three experiments were gradually reduced. For plant regeneration, the somatic embryos obtained in the first experiment were inoculated in an MS medium, without any plant growth regulation, added of 2.5 g.L^{-1} activated charcoal, while those ones originated from the second experiment were inoculated in $\frac{1}{2}$ MS medium also without plant growth regulation, but added of 1.5 g.L^{-1} activated charcoal. It was verified that Picloram was more efficient than 2,4-D for calli induction and somatic embryos formation, from immature inflorescences. Immature tissues (stage I) necessarily were not more responsive in terms of dedifferentiation and consequently calli formation than the ones less immature tissues (stages II and III), although more embryogenic than these. The somatic embryogenesis process was relatively slow, asynchronous and marked by abnormalities, as fusionated somatic embryos. It is hypothesized that regeneration was limited by fusion and precocious germination (root emissions), which are essential for somatic embryos conversion, highlighting the necessity of maturation phase optimization for improve somatic embryos germination. Anatomically, the analysis confirmed the bipolar organization of somatic embryos, with caulinar and root meristems, besides absence of vascular connections with the origin explants. The histological analysis suggest multicellular origin of the somatic embryos formed and make evident the similarities of these with the zygotic embryos of the species. As for mature inflorescences, embryogenic calli were observed only in longitudinally sectioned pistillate flowers. These explants are presented as an alternative source for somatic embryogenesis of gueroaba, despite the great degree of the tissues differentiation

Keywords: Palm tree; inflorescences; flowers; auxins; callogenesis; somatic embryos.

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE GUEROBA [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] A PARTIR DE INFLORESCÊNCIAS

1. INTRODUÇÃO

Syagrus oleracea (Mart.) Becc., popularmente conhecida como gueroba, é uma palmeira típica da região Central do Brasil, cujo cultivo se projeta como uma excelente opção de diversificação de renda do pequeno e médio produtor rural, dada a sua multiplicidade de usos. Essa espécie fornece uma gama de produtos úteis, com destaque para os frutos e sementes utilizados na culinária local ou ainda consumidos *in natura* (DINIZ; SÁ, 1995; AGUIAR; ALMEIDA, 2000) e o palmito de sabor adstringente e amargo, com altos teores de vitamina “C” (SHIMOKOMAKI *et al.*, 1975).

Apesar de ser já cultivada e com potencial econômico conhecido, a espécie apresenta um déficit expressivo de conhecimento técnico-científico em diferentes pontos da sua cadeia produtiva, inclusive, com relação à propagação, cultivo em geral e lançamento de variedades. A sua propagação é realizada exclusivamente via sementes, que apresenta os inconvenientes da germinabilidade lenta e desuniforme (MELO, 2000) e da baixa viabilidade de suas sementes, particularmente, em função da destruição do endosperma e embrião, ocasionada pelo bicho do coco (coleóptero *Pachymerus nucleorum* Fabr. - Bruchidae) (GARCIA; VIEIRA; COSTA, 1979; GARCIA; ROSA; COSTA, 1980; DINIZ; SÁ, 1995; DIAS, 2012). Ademais, a alta heterogeneidade resultante da fecundação cruzada dificulta sua produção em escala comercial.

Salienta-se ainda que, não diferente de outras palmeiras, a gueroba possui características que limitam a sua propagação vegetativa, como a ausência de crescimento secundário e o não perfilhamento (único estipe por planta). Dentro dessa conjuntura, o desenvolvimento de métodos eficientes de propagação se faz necessário para garantir a exploração comercial sustentável da espécie, bem como a iniciação de programas de melhoramento, mediante propagação de genótipos com performance conhecida em campo. Assim, o emprego de técnicas de propagação baseadas na cultura de tecidos *in vitro* é de grande utilidade.

Para palmeiras a embriogênese somática é a técnica mais utilizada (STEINMACHER; CLEMENT; GUERRA, 2007), estudada (GUEDES *et al.*, 2011) e eficiente para fins de propagação *in vitro*, já aplicada com sucesso em pelo menos 18

espécies e dezenas de variedades (REE; GUERRA, 2015). Essa técnica, expressão da totipotencialidade celular, envolve a transição de células somáticas para estruturas similares a embriões zigóticos (EMONS, 1994; SCHUMANN *et al.*, 1995; VON ARNOLD *et al.*, 2002), sem que ocorra fusão de gametas (WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986), o que resulta em plantas geneticamente idênticas às células somáticas iniciais.

A propagação por embriogênese somática de palmeiras adultas selecionadas em campo exige fontes alternativas de explantes, como flores maduras e ráquulas de inflorescências imaturas (SANDOVAL-CANCINO *et al.*, 2016). Essas últimas são consideradas uma das fontes mais promissoras para a propagação clonal de palmeiras (GUEDES *et al.*, 2011), dado o vasto quadro de vantagens: as inflorescências imaturas são protegidas por bainhas que previnem contaminações (fúngicas e bacterianas) (GADALLA *et al.*, 2017) e evitam possíveis danos ocasionados pelos produtos químicos utilizados no processo de assepsia (TEIXEIRA; SIINDAHL; KIRBY, 1994; SIDKY; ELDAWYATI, 2012); exibem alto número de meristemas florais por inflorescência (GUEDES *et al.*, 2011) e conseqüente, maior potencial embriogênico de calos originados (FKI *et al.*, 2011); possibilitam a clonagem do material de origem (REE; GUERRA, 2015) e portanto, de genótipos superiores; muitas espécies exibem produção abundante de inflorescências e a escolha desse explante evita o sacrifício da planta mãe fornecedora do material (TISSERAT, 1979; GUEDES *et al.*, 2011; SIDKY; ELDAWYATI, 2012; JAYANTHI *et al.*, 2015), por meio do conhecimento prévio da disposição das inflorescências na planta doadora e, em função, do grau de maturidade da espata a ser utilizada.

Isto posto, o presente estudo teve como objetivo desenvolver um protocolo de embriogênese somática e de conseqüente regeneração de plantas de gueroba [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.], a partir de inflorescências imaturas. Enfatiza-se que este é o primeiro relato de embriogênese somática e obtenção de plantas de gueroba por meio de embriogênese somática. Adicionalmente, investigaram-se os eventos iniciais da calogênese, a partir de flores maduras da espécie, visando subsidiar a embriogênese somática futura. Eventos anatômicos e histoquímicos subjacentes aos processos também foram analisados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), situado em Brasília-DF.

2.1 Experimento 1: Influência de auxinas em baixa concentração na indução de calos, formação de embriões somáticos e regeneração de plantas

2.1.1 Material vegetal e indução de calos

Para a realização deste experimento foram utilizadas como fonte de explantes inflorescências imaturas de gueroba (*Syagrus oleracea*), coletadas entre folhas internas aclorofiladas de palmito (Figura 1A), provenientes de uma matriz adulta localizada no município de Itaberaí, Goiás, Brasil (Coordenadas: 16° 4' 28.12" S e 49° 43' 18.08" O).

Inicialmente, espatas fechadas e aclorofiladas, com diferentes comprimentos (6,0; 11,5; 17,0; 21,5; 30,0; 35,0 e 41,5 cm) (Figura 1B), contendo no seu interior inflorescências com diferentes graus de maturidade, foram submetidas a um processo de desinfestação, em câmara de fluxo laminar, por meio da imersão em álcool etílico 70% (v/v) por três minutos, seguida por imersão em hipoclorito de sódio (NaOCl) (2,5% de cloro ativo) por 40 minutos, e, posterior, tríplice lavagem em água destilada e autoclavada por cinco minutos cada.

Após a desinfestação, em câmara de fluxo laminar e com o auxílio de pinças e bisturis, as espatas foram cuidadosamente abertas, expondo a raque contendo as ráquulas imaturas.

Logo em seguida, as ráquulas foram seccionadas em segmentos variando entre 0,5 – 1,0 cm de comprimento e então foram sujeitas a dois tratamentos caracterizados por inoculação em meio basal de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 0,2 g.L⁻¹ de cisteína e auxinas ácido 4-amino-3, 5, 6-tricloropicolínico (Picloram) ou ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) na concentração de 4,52 µM cada. O pH foi ajustado para 5,8 ± 0,1 antes da adição do agente gelificante (2,5 g.L⁻¹ de *Phytigel* - Sigma, St. Louis, MO) e o meio esterilizado por autoclavagem à 121 °C durante 20 minutos à 1,5 atm de pressão. As ráquulas foram inoculadas em quatorze placas de cada auxina (duas placas de cada comprimento de espata).



Figura 1. Espatas contendo inflorescências imaturas de gueroba (*Syagrus oleracea*) utilizadas como explantes iniciais para embriogênese somática. A: Espata na axila de folha aclorofilada. B: Espatas fechadas e aclorofiladas utilizadas neste experimento, com diferentes comprimentos e graus de maturidade. C: Aspecto da inflorescência imatura inoculada em meio de indução. Barras = A: 2 mm; B: 15 cm e C: 1 mm.

O cultivo foi realizado em placas de *Petri* (15 x 90 mm), seladas com filme PVC transparente, contendo aproximadamente 25 mL de meio de cultura por placa. Os materiais foram mantidos sob escuro, em sala de crescimento à 25 ± 2 °C, por 270 dias em escuro, sem realização de subcultivos.

2.1.2 Diferenciação e maturação de embriões somáticos

Os explantes contendo calos embriogênicos foram transferidos para a mesma formulação de sais do meio de cultura da etapa de indução, acrescido de 30 g.L^{-1} de sacarose, $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de glutamina, $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de cisteína, $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de caseína hidrolisada e auxinas Picloram ou 2,4-D reduzidas, mensalmente, para $2,26 \mu\text{M}$, $0,45 \mu\text{M}$ e $0,045 \mu\text{M}$.

Nesse estágio, os agregados embriogênicos foram cultivados em placas de *Petri* (20 x 100 mm), contendo aproximadamente 25 mL de meio de cultura por placa, seladas com filme PVC (policloreto de polivinila) transparente e armazenadas em sala de crescimento escura à 25 ± 2 °C.

2.2 Experimento 2: Influência de diferentes auxinas em altas concentrações e de inflorescências com diferentes graus de maturidade na indução de calos, formação de embriões somáticos e regeneração de plantas

2.2.1 Material vegetal e indução de calos

Para a realização deste experimento, uma parte das inflorescências provenientes das espatas coletadas para a realização do experimento 1 (tópico 2.1.1) foi utilizada como fonte de explante. As inflorescências foram então classificadas em pelo menos três intervalos de tamanho e consequentes graus de maturidade, de acordo com o comprimento das espatas, como segue: estágio I (6-17 cm), estágio II (21,5-35 cm) e estágio III (41,5 cm).

As ráquulas provenientes das espatas com diferentes comprimentos foram seccionadas em câmara de fluxo laminar, em segmentos variando entre 0,5 – 1,0 cm de comprimento, e inoculadas em meio basal de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de dois tipos de auxinas: Picloram ou 2,4-D, cada uma adicionada em quatro concentrações (0, 225, 450 e 675 μM). Ao meio de cultura básico de MS ainda foram acrescentados 30 g.L^{-1} de sacarose, 0,2 g.L^{-1} de glutamina, 0,2 g.L^{-1} de cisteína e 2,5 g.L^{-1} de carvão ativado. Os processos de gelificação do meio, ajuste do pH e autoclavagem foram os mesmos mencionados no tópico 2.1.1.

Os cultivos foram realizados em placas de *Petri* (90 x 15 mm), seladas com filme PVC transparente, contendo aproximadamente 25 mL de meio de cultura por placa, as quais foram mantidas no escuro em sala de crescimento à 25 ± 2 °C.

Os subcultivos foram realizados a cada 30 dias e a percentagem de explantes oxidados (tecidos totalmente escurecidos) e a percentagem de formação de calo primário (sem considerar a quantidade e a qualidade do calo) foram determinadas aos 180 dias. Já a percentagem de calo embriogênico (capaz de formar embriões somáticos) foi determinada aos 240 dias. A percentagem de explantes oxidados foi obtida através da razão entre a quantidade de explantes oxidados e o número total de explantes por placa, multiplicada por 100. A percentagem de explantes com calo primário foi calculada da mesma forma supracitada, enquanto que a percentagem de calos embriogênicos foi calculada com base no número inicial de calos primários.

2.2.2 Diferenciação e maturação de embriões somáticos

Para a diferenciação de embriões somáticos, os explantes contendo calos embriogênicos foram transferidos para a mesma formulação de sais do meio de cultura da etapa de indução, acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose, 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 0,5 g.L⁻¹ de cisteína e 0,5 g.L⁻¹ de caseína hidrolisada, contudo, com as concentrações de carvão ativado e auxinas Picloram e 2,4-D, reduzidas para 0,1 g.L⁻¹ e 40 µM, respectivamente, onde permaneceram por 30 dias. Em seguida, a concentração de ambas auxinas foi reduzida a cada mês para 10 µM, 5 µM e 1 µM. Os explantes permaneceram nessa última concentração, em meio totalmente desprovido de carvão ativado, por 60 dias. Logo após, também mensalmente, a concentração das auxinas foi reduzida para 0,45 µM e 0,045 µM, com remoção total do carvão ativado.

Nesse estágio, os agregados embriogênicos foram cultivados em placas de *Petri* (20 x 100 mm), contendo aproximadamente 25 mL de meio de cultura por placa, seladas com filme PVC (policloreto de polivinila) transparente e armazenadas em sala de crescimento escura à 25° ± 2 °C.

Os subcultivos foram realizados mensalmente e o número de embriões somáticos foi determinado aos 150 dias em meio de diferenciação.

2.3 Experimento 3: Influência de diferentes explantes provenientes de flores femininas maduras na indução de calos

2.3.1 Material vegetal

Foram utilizadas como fonte de explantes flores femininas extraídas de inflorescências maduras de gueroba, coletadas de uma matriz adulta (Figura 2A) localizada no município de Itaberaí, Goiás, Brasil (Coordenadas: 16°4'28.12" S e 49°43'18.08" O) (Anexo 1). No ato da coleta, foram selecionadas inflorescências em estágio anterior à antese, isto é, ainda totalmente encobertas pela espata esverdeada (Figura 2A, B). Para a coleta, as folhas próximas à espata fechada foram removidas, para que o pecíolo da espata selecionada fosse seccionado o mais próximo do estipe, evitando danos ao material coletado e à planta mãe.

Uma vez coletada, a espata contendo as inflorescências no seu interior foi desinfestada conforme mencionado no item 2.1.1.

2.3.2 Indução de calos

Após a desinfestação, em câmara de fluxo laminar e com o auxílio de pinças e bisturis, a espata foi cuidadosamente aberta (Figura 2B), expondo as ráquulas contendo as flores estaminadas e pistiladas (Figura 2C). As flores estaminadas foram descartadas e as flores pistiladas foram utilizadas como fontes de explantes na indução de calos (Figura 2D, E). Três tipos de explantes foram utilizados: a flor pistilada fechada, caracterizando a testemunha (Figura 2D); a flor pistilada seccionada longitudinalmente e o carpelo (Figura 2F) seccionado longitudinalmente.

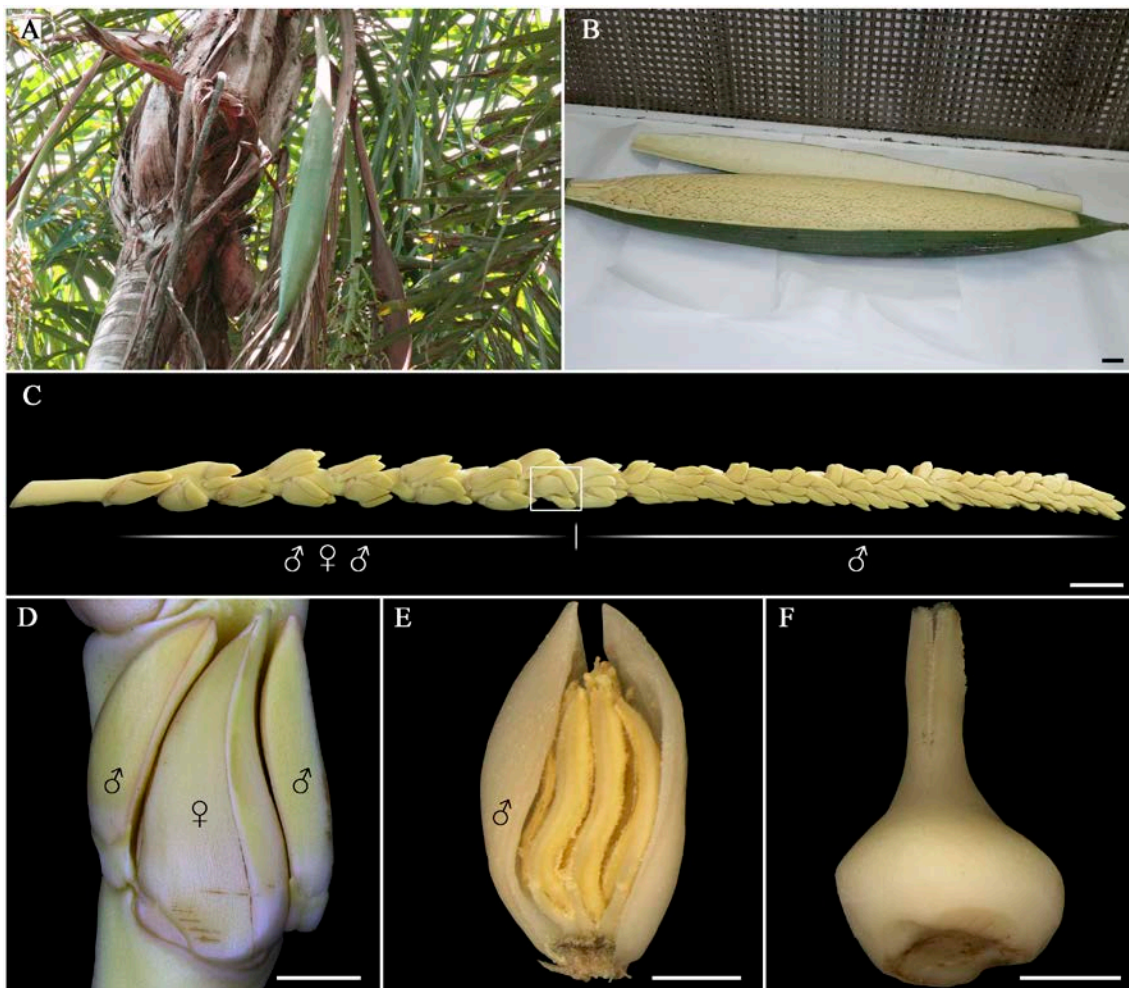


Figura 2. Obtenção de flores maduras de guero (*Syagrus oleracea*) para indução de calos visando à embriogênese somática. A: Espata fechada coletada em campo. B: Espata aberta em câmara de fluxo laminar com flores maduras expostas. C: Ráquila contendo as flores estaminadas e pistiladas. D: Tríade formada por uma flor pistilada central e duas flores estaminadas laterais. E: Flor estaminada com anteras expostas. F: Carpelo extraído da flor pistilada. Barras = B: 6 cm; C: 2 cm; D: 5 mm e E, F: 2 mm.

Os diferentes explantes foram inoculados em meio basal de MS, suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 2,5 g.L⁻¹ de carvão e 450 µM de Picloram. Os processos de gelificação do meio, ajuste do pH e autoclavagem foram os mesmos mencionados no tópico 2.1.1.

Os cultivos foram realizados em placas de *Petri* (15 x 90 mm), seladas com filme PVC transparente, contendo aproximadamente 25 mL de meio de cultura por placa, as quais foram mantidas no escuro em sala de crescimento à 25 ± 2 °C por 240 dias.

Os subcultivos foram realizados a cada 30 dias e a porcentagem de explantes oxidados (tecidos totalmente escurecidos) e a porcentagem de explantes com calo primário (sem considerar a quantidade e a qualidade do calo) foram determinadas aos 180 dias. Já a porcentagem de calos com potencial embriogênico (calos com zona meristemática definida ou totalmente meristemáticos) foi determinada aos 270 dias. As porcentagens foram calculadas segundo especificações do tópico 2.1.1.

2.3.3 Diferenciação de embriões somáticos

Para a diferenciação de embriões somáticos, os explantes contendo calos embriogênicos foram transferidos para a mesma formulação de sais do meio de cultura da etapa de indução, acrescidos de 30 g.L⁻¹ de sacarose, 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 0,5 g.L⁻¹ de cisteína e 0,5 g.L⁻¹ de caseína hidrolisada, contudo, com as concentrações de carvão ativado e auxina Picloram, reduzidas para 0,1 g.L⁻¹ e 40 µM, respectivamente, onde permaneceram por 30 dias. Em seguida, a concentração da auxina foi reduzida, a cada mês, para 10 µM, 5 µM e 1 µM. Os explantes permaneceram nessa última concentração, em meio totalmente desprovido de carvão ativado, por 60 dias. Em seguida, a concentração da auxina foi reduzida para 0,45 µM por 30 dias e, posteriormente, para 0,045 µM por 90 dias, com remoção total do carvão ativado.

Nesse estágio, os agregados embriogênicos foram cultivados em placas de *Petri* (20 x 100 mm), contendo aproximadamente 25 mL de meio de cultura por placa, seladas com filme PVC (policloreto de polivinila) transparente e armazenadas em sala de crescimento escura à 25° ± 2 °C. Os subcultivos foram realizados mensalmente.

2.4 Regeneração de plantas

Para conversão completa em plantas, embriões somáticos provenientes dos experimentos citados acima foram inoculados em meio de regeneração, até o desenvolvimento de raiz e parte aérea, caracterizado por:

Experimento 1: meio básico original com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 0,5 g.L⁻¹ de cisteína, 0,5 g.L⁻¹ de caseína hidrolisada e 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, por 150 dias.

Experimento 2: meio básico original “meia força” (½ de MS – 50% dos macronutrientes e micronutrientes) com 30 g.L⁻¹ de sacarose e 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, por 210 dias.

Os explantes foram cultivados em potes (5 x 10 cm), com aproximadamente 30 mL de meio de cultura, selados com filme PVC transparente e armazenados em sala de crescimento à temperatura de 25° ± 2 °C, luminosidade de 50 µm.m².s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas.

Tabela 1. Composição dos meios de cultura e períodos de tempo (dias) utilizados no processo de embriogênese somática em gueroba (*Syagrus oleracea*) a partir de inflorescências imaturas sob influência de diferentes auxinas em baixa concentração na fase de indução de calos (Experimento 1)

Componentes	Indução de calos	Diferenciação de embriões somáticos			Regeneração de plantas
Meio de cultura	MS	MS	MS	MS	MS
Glutamina (g.L ⁻¹)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Cisteína (g.L ⁻¹)	0,2	0,5	0,5	0,5	0,5
Caseína hidrolisada (g.L ⁻¹)	-	0,5	0,5	0,5	0,5
Picloram (µM)	4,52	2,26	0,45	0,045	-
2,4-D (µM)	4,52	2,26	0,45	0,045	-
Sacarose (g.L ⁻¹)	30	30	30	30	30
<i>Phytigel</i> (g L ⁻¹)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Carvão vegetal (g L ⁻¹)	-	-	-	-	2,5
Períodos (dias)	270	30	30	30	150

Tabela 2. Composição do meio de cultura e períodos (dias) utilizados no processo de embriogênese somática em gueroba (*Syagrus oleracea*) a partir de inflorescências imaturas, com diferentes graus de maturidade, sob influência de diferentes auxinas em altas concentrações na fase de indução de calos (Experimento 2)

Componentes	Indução de calos	Diferenciação de embrião somático						Regeneração de plantas
		MS	MS	MS	MS	MS	MS	
Meio de cultura	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	½ MS
Glutamina (g.L ⁻¹)	0,2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Cisteína (g.L ⁻¹)	0,2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Caseína hidrolisada (g.L ⁻¹)	-	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Picloram (µM)	0, 225, 450 e 675	40	10	5	1	0,45	0,045	-
2,4 D (µM)	0, 225, 450 e 675	40	10	5	1	0,45	0,045	-
Sacarose (g.L ⁻¹)	30	30	30	30	30	30	30	30
Phytigel (g.L ⁻¹)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Carvão vegetal (g.L ⁻¹)	2,5	0,1	0,1	0,1	-	-	-	1,5
Períodos (dias)	240	30	30	30	60	30	30	210

Tabela 3. Composição do meio de cultura e períodos (dias) utilizados no processo de indução de calos visando à embriogênese somática em gueroba (*Syagrus oleracea*) a partir de diferentes explantes provenientes de flores femininas maduras (Experimento 3)

Componentes	Indução de calos	Diferenciação de embrião somático					
		MS	MS	MS	MS	MS	MS
Meio de cultura	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Glutamina (g.L ⁻¹)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Cisteína (g.L ⁻¹)		0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Caseína hidrolisada (g.L ⁻¹)		0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Picloram (µM)	450	40	10	5	1	0,45	0,045
Sacarose (g.L ⁻¹)	30	30	30	30	30	30	30
Phytigel (g.L ⁻¹)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Carvão vegetal (g.L ⁻¹)	2,5	0,1	0,1	0,1	-	-	-
Períodos (dias)	270	30	30	30	60	30	90

2.5 Análises anatômica e histoquímica

Para a análise anatômica foram coletadas amostras de materiais não cultivados (tempo 0 – inflorescências imaturas), de diferentes formações calogênicas e de embriões em diferentes estádios de desenvolvimento. As etapas de fixação, desidratação e emblocamento do material vegetal coletado 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 M (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 M, pH 7,2), por um período de 1 hora cada (sob vácuo); logo após, desidratação em série alcoólica crescente (30%, 50%, 70% - 100%, 100%), por uma hora cada (sob vácuo) e infiltração em historesina (Leica, Heidelberg, Alemanha), segundo as especificações do fabricante.

Posteriormente, cortes longitudinais e transversais (3-7 μm) foram obtidos em micrótomo rotativo manual (Leica®, RM212RT), distendidos e aderidos às lâminas microscópicas em placa aquecida à 40 °C. As secções obtidas foram coradas com Azul de Toluidina (0,5%) para caracterização estrutural e identificação de compostos fenólicos (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1964).

As secções obtidas a partir do material embocado foram submetidas aos seguintes testes histoquímicos: *Periodic Acid Schiff* – PAS (O'BRIEN; MCCULLY, 1981) usado para identificar polissacarídeos neutros; reagente Lugol (JOHANSEN, 1940) para detecção de grãos de amido, *Xylidine Ponceau* – XP utilizado para identificação de proteínas (VIDAL, 1970) e Dicromato de Potássio para visualização de compostos fenólicos não estruturais (GABE, 1968). A obtenção e análise de imagens foram realizadas via microscópio Leica DM 750 e programa Leica Application Suite EZ.

Para a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), amostras coletadas foram fixadas em Karnovsky (JOHANSEN, 1940) por 24 h, enxaguadas em tampão de cacodilato de sódio (0,05 M, pH 7,1) e pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 2% e tampão cacodilato de sódio por 03 horas. Em seguida, foram lavadas três vezes em mesmo tampão de fixação, desidratadas em série etanólica crescente (25 a 100%), submetidas ao ponto crítico com CO₂ e metalizadas com ouro-paládio. As observações e captação de imagem foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Varredura Zeiss DSM 962.

Para a Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET), as amostras foram fixadas em Karnovsky (JOHANSEN, 1940) e mantidas à 4° C por cerca de 24 horas. Logo após, foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio 2% em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2). Para pós-fixação, essas amostras foram imersas em acetato de uranila 0,5% (contratação *in bloc*) durante 24 horas à 4°C e desidratadas em série crescente de etanol (10 a 100%). Seguiu-se a infiltração com resina Epon 812 ©, conforme protocolo do fabricante. A inclusão foi feita em moldes próprios para polimerização à 70°C. Secções ultrafinas (60 nm) foram obtidas utilizando ultramicrótomo Leica, as quais foram

contrastadas com acetato de uranila 5% por 1 hora em condições escuras. As amostras foram analisadas e fotodocumentadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET - Zeiss modelo EM 109).

2.6 Análises estatísticas

Todos os experimentos foram montados em delineamento estatístico inteiramente casualizado.

Os dados obtidos com o uso de auxinas, concentrações e estádios de diferenciação dos explantes (Experimento 2) foram avaliados segundo esquema fatorial 2 x 4 x 3: duas auxinas (Picloram e 2,4-D), quatro concentrações (0, 225, 450 e 675 μM) e três estádios de maturidade (Estádio I, II e III), totalizando 24 tratamentos. Cada tratamento foi composto por seis repetições, com cinco explantes cada.

Para análise dos tipos de explantes provenientes de flores femininas maduras na indução de calos (Experimento 3) foram utilizadas 10 repetições, com três explantes cada.

O conjunto de dados obtido foi submetido à análise de variância (ANOVA) e, quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de significância, por meio do software estatístico R (R CORE TEAM, 2015).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Experimento 1: Influência de auxinas em baixa concentração na indução de calos, formação de embriões somáticos e regeneração de plantas

3.1.1 Indução de calos

Após 270 dias de cultivo em meio basal provido de baixa concentração de auxina (4,52 μM), verificou-se a formação de calos primários com consistência mucilaginosa, calos embriogênicos compactos, nodulares, amarelos, a maioria, com superfície lisa e brilhante (Figura 3A) e calos embriogênicos sem formato definido e superfície irregular (Figura 3B). Ressalta-se que formações embriogênicas só foram observadas em explantes sob efeito de Picloram. A superioridade dessa auxina, de acordo com Karun *et al.* (2004), é consequência da sua eficiência de absorção/mobilização e da sua rápida metabolização em sítios específicos. Além de calos, verificou-se a formação de embriões somáticos em estágio semelhante ao globular (Figura 3B), alguns fusionados.

3.1.2 Diferenciação e maturação de embriões somáticos

Nessa fase, de modo geral, verificou-se gradualmente a conversão dos calos embriogênicos em embriões somáticos e evolução dos embriões somáticos já formados na fase de indução para estádios mais avançados, caracterizados por coloração esbranquiçada opaca (Figura 3C) e alguns, com formato alongado, semelhante ao estágio torpedo (Figura 3D). Ressalta-se que o processo foi nitidamente assincrônico e apresentou uma taxa relativamente alta de embriões somáticos fusionados (Figura 3C), o que pode estar relacionada com a disformidade durante a polarização das unidades embriogênicas de origem multicelular (MICHAUX-FERRIÈRE; GROUT; CARRON, 1992), origem proposta no presente trabalho. Essa assincronia, característica comum em outros sistemas embriogênicos (STEINMACHER; CLEMENT; GUERRA, 2007; 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. Outra possível explicação, seria a influência das diferenças na

disponibilidade de componentes do meio, em função dos gradientes formados em meios semi-sólidos.

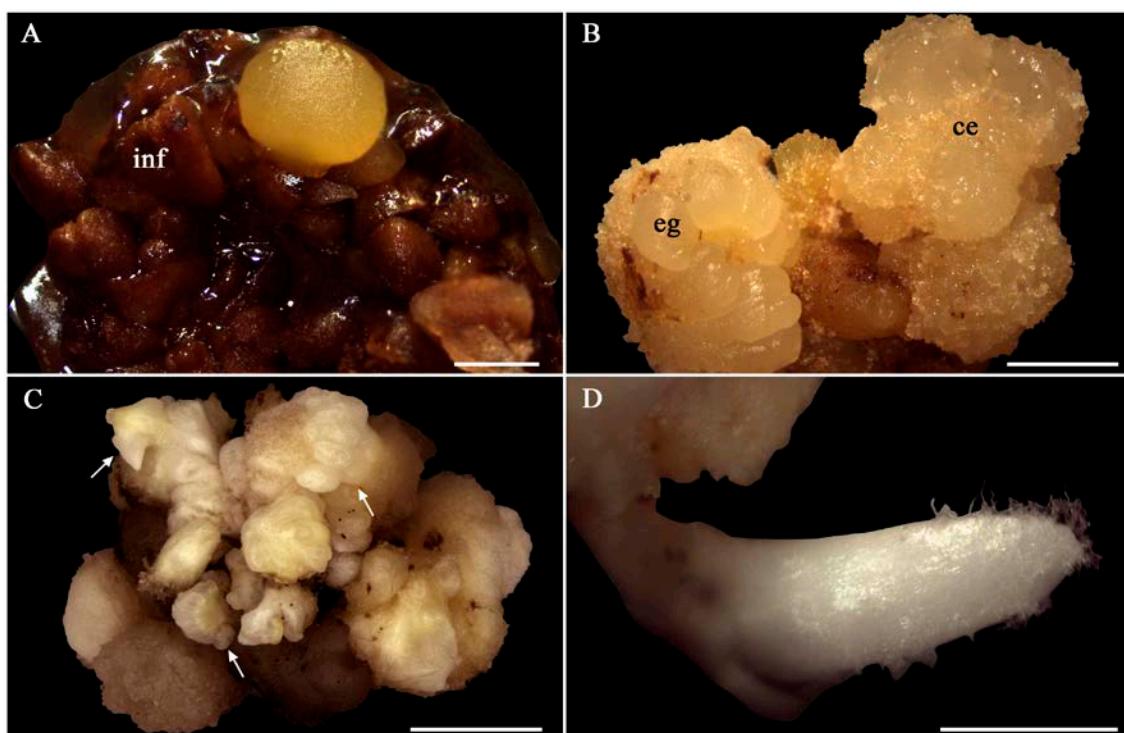


Figura 3. Estádios morfológicos da indução de calos e diferenciação de embriões somáticos, a partir de inflorescências imaturas de guero (*Syagrus oleracea*). A: Calo embriogênico nodular amarelo. B: Calo embriogênico sem formato definido e superfície irregular e embriões somáticos globulares. C: *Cluster* de embriões somáticos brancos. D: Embrião somático em estágio semelhante ao torpeda; notar tricomas. Abreviações: (ce) calo embriogênico, (eg) embrião somático globular e (inf) inflorescência. Barras = A: 1 mm; B, D: 2 mm e C: 5 mm.

3.1.3 Regeneração de plantas

Após os primeiros 120 dias, em meio totalmente desprovido de reguladores e sob condição de luz, foram observadas duas diferentes respostas: germinação (emissão de parte aérea e sistema radicular) de alguns poucos embriões somáticos (Figura 4G), inclusive, com presença de tricomas (Figura 4E, F), e emissão somente da parte aérea de uma porção significativa dos embriões somáticos, que adquiriu, gradativamente, pigmentação verde. A presença de tricomas em embriões somáticos de guero não é um fato isolado à espécie. Tricomas também foram relatados em embriões somáticos de outras monocotiledôneas como *Saccharum* sp. (GUIDERDONI; DEMARLY, 1988) e *Brachiaria brizantha* (CABRAL *et al.*, 2015) e em dicotiledôneas como *Theobroma cacao* (MAXIMOVA *et al.*, 2002).

Alguns agrupamentos de embriões somáticos, embora tenham emitido ambos meristemas, exibiram uma quantidade limitada de raízes para múltiplos brotos, o que dificultou a individualização de cada broto e subsequente aclimatização, assim como relatado por Jayaraj *et al.* (2015). Aqueles que emitiram somente parte aérea necrosaram, impossibilitando a adoção de um tratamento adicional de enraizamento. O desenvolvimento da parte aérea antes do sistema radicular foi considerado um processo de conversão direta de embriões somáticos em *C. nucifera* (SAÉNZ *et al.*, 2006; PERERA *et al.*, 2009a, b).

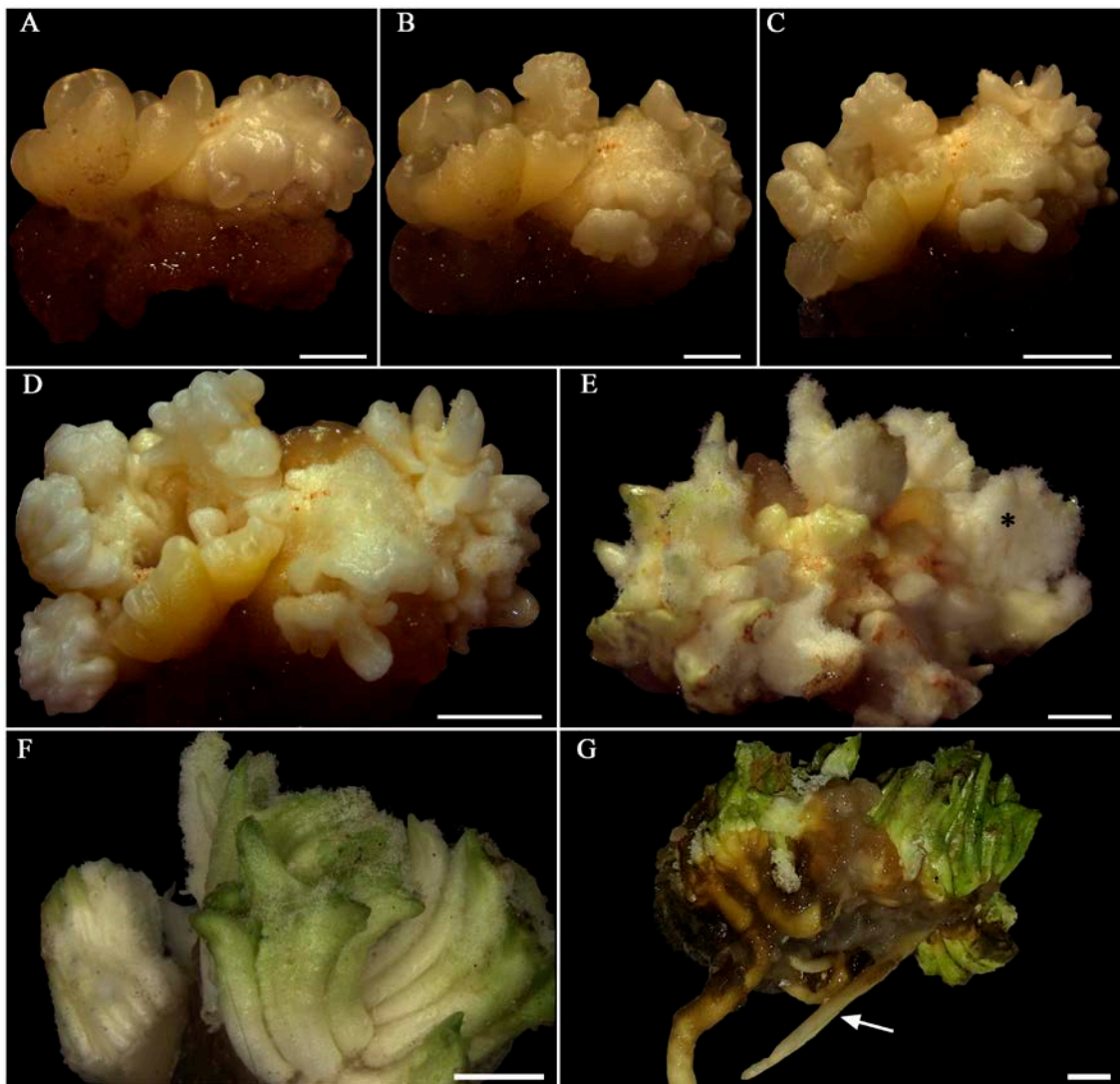


Figura 4. Evolução morfológica do calo primário a plantas de guerobera (*Syagrus oleracea*) a partir de inflorescência imatura, em meio com Picloram. A-D: Desenvolvimento de embriões somáticos aos 30, 60, 120 e 150 dias, respectivamente, em meio de indução. E, F: Embriões somáticos aos 210 e 240 dias, respectivamente, em meio de indução; notar esverdeamento, presença de tricomas e fusão. G: Plantas fusionadas. Barras = A: 1 mm e B-G: 2 mm.

3.1.4 Análises anatômica e histoquímica

As análises histológicas dos calos embriogênicos obtidos a partir das inflorescências imaturas revelam características anatômicas diferentes. Calos embriogênicos compactos, nodulares, amarelos e com superfície lisa e brilhante (Figura 3A, 5A) exibem uma ampla zona interna composta por células com características meristemáticas (células pequenas, com citoplasma denso, núcleos volumosos, nucléolos evidentes, vacúolos fragmentados e intensa divisão celular) e uma zona periférica mais estreita formada por células com características parenquimáticas altamente vacuoladas (Figura 5B). A região limítrofe entre as duas zonas se assemelha àquela descrita como *like-cambium* por Schwendiman, Pannetier e Michaux-Ferriere (1988), em calos oriundos de tecidos foliares de *Elaeis guineensis*, e por Verdeil *et al.* (1994), em calos provenientes de inflorescência imaturas de *C. nucifera*.

Já os calos embriogênicos sem formato definido e superfície irregular (Figura 3B, 5E) apresentam um padrão oposto ao já mencionado, caracterizado por células parenquimáticas com vacuolação variável localizadas mais internamente e por células com características meristemáticas (em diferentes fases da mitose) localizadas na região periférica do calo (Figura 5F). A análise histológica desses últimos calos sugere a origem multicelular dos embriões somáticos obtidos; notar aquisição de protoderme por parte de complexo multicelular (Figura 5G).

Em termos histoquímicos, os reagentes PAS e Lugol revelaram grande conteúdo polissacarídico (grãos de amido), sobretudo, na zona periférica adjacente à meristemática, em ambos os calos embriogênicos analisados (Figura 5C, D, H), provavelmente, subsidiando-a em termos energéticos, padrão também observado por Plata, Ballester e Vieitez (1991).

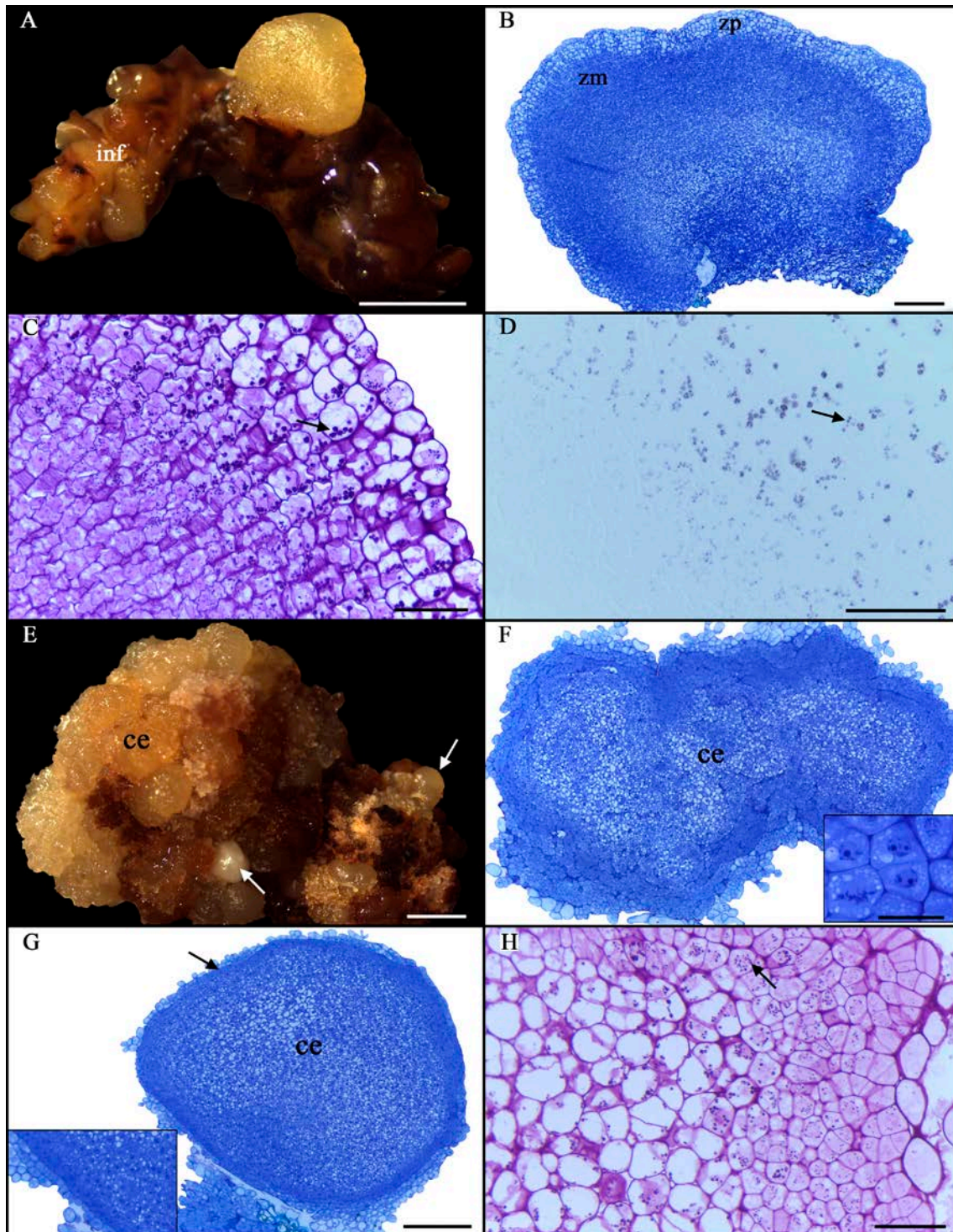


Figura 5. Análise morfoanatômica das diferentes respostas de inflorescências imaturas de gueroba (*Syagrus oleracea*) submetidas ao processo de embriogênese somática. A: Calo embriogênico nodular amarelo. B: Secção anatômica do calo mencionado na letra A; observar zona meristemática e zona parenquimática. C, D: Grãos de amido (seta) na camada adjacente à zona meristemática evidenciados por meio dos reagentes *Periodic Acid Schiff* (PAS) e Lugol, respectivamente. E: Calo embriogênico sem formato definido e superfície irregular e embriões somáticos globulares (setas). F: Secção anatômica de calo embriogênico; atinar para células periféricas em intensa divisão celular (quadrado lateral). G: Transição de calo embriogênico para embrião somático

em estágio globular; observar protoderme em formação (seta, quadrado). H: Detalhe da letra F evidenciando grãos de amido (seta) na camada adjacente à zona meristemática. Abreviações: (ce) calo embriogênico, (inf) inflorescência, (zm) zona meristemática e (zp) zona periférica. Barras = A, E: 2 mm; B, F, G: 200 μ M e C, D, H: 50 μ M.

Com relação a histologia dos embriões somáticos obtidos, a presença de protoderme (YEUNG, 1995; QUIROZ-FIGUEROA *et al.*, 2002; SHARMA; MILLAM, 2004; JALIL *et al.*, 2008) e de cordões procambiais evidentes (independente do calo – sem conexão com o tecido materno) os confirmam como embriões somáticos verdadeiros (RAJU *et al.*, 2014; RAJU; ASLAM; SHAJAHAN, 2015; DELPORTE *et al.*, 2014) (Figura 6).

As análises histoquímicas (*Periodic Acid Schiff* – PAS, reagente Lugol e *Xylidine Ponceau* – XP) não identificaram a presença de reservas de natureza polissacarídica e proteica nos embriões somáticos obtidos. Vale mencionar que as principais reservas dos embriões zigóticos da espécie são de natureza proteica e lipídica (Figura 6F-J), com amido limitado à resquícius na região haustorial e nas proximidades da plúmula.

A total ausência de proteína em embriões somáticos em estágio de desenvolvimento mais avançado está em concordância com outros trabalhos em palmeiras (GOH *et al.*, 2001; SANÉ *et al.*, 2006) e alerta para a necessidade de otimização das condições de maturação, que permitam a acumulação de reservas suficientes para uma germinação satisfatória dos embriões somáticos obtidos. Nesse trabalho, hipotetiza-se que as baixas taxas de germinação possam ser consequência da acumulação deficitária de proteínas (confirmada por análises com reagente XP – resultados negativos) e lipídeos (necessidade de confirmação em análises futuras) comparada ao observado em embriões zigóticos da espécie (Figura 6F-J), o que evidencia a necessidade de otimização posterior da etapa de maturação, mediante manipulação dos componentes do meio de cultura.

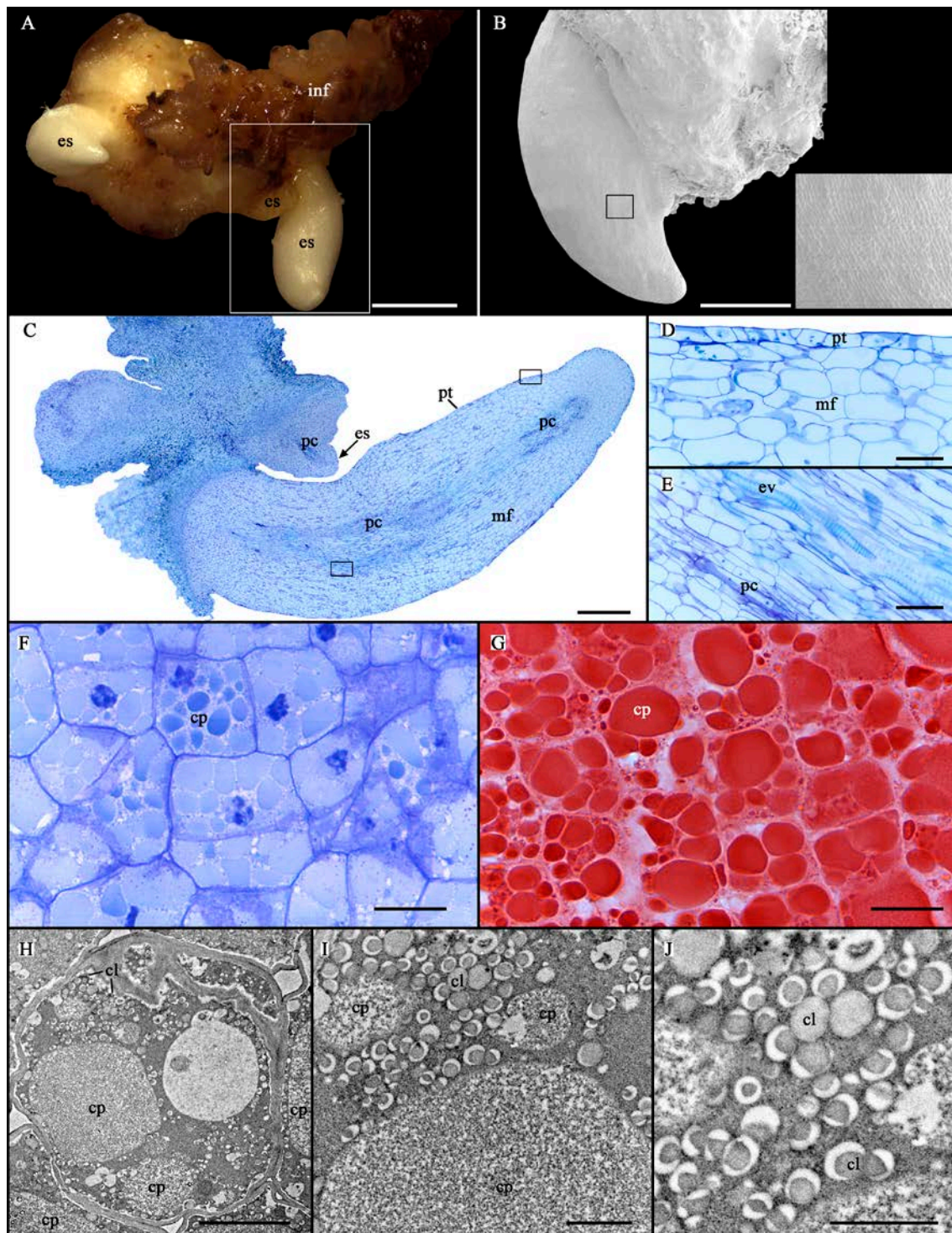


Figura 6. Análise morfoanatômica de embriões somáticos desenvolvidos a partir de calos embriogênicos oriundos de inflorescência imatura de gueroba (*Syagrus oleracea*). A: Embriões somáticos. B: Superfície de embrião somático por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). C: Secção anatômica longitudinal de embriões somáticos; atentar-se à protoderme e procâmbio. D: Detalhe da protoderme e meristema fundamental sem conteúdo citoplasmático denso. E: Detalhe do procâmbio com elementos de vaso diferenciados. F: Secção anatômica do meristema fundamental de embrião zigótico de gueroba; notar presença de conteúdo citoplasmático denso caracterizado por corpos proteicos. G: Corpos proteicos, corados com XP, presentes em células do meristema

fundamental de embrião zigótico de gueroba. H: Ultraestrutura de célula do meristema fundamental de embrião zigótico de gueroba; notar presença de corpos proteicos conspicuos e corpos lipídicos abundantes. I, J: Letra H em maior magnificação. Abreviações: (cp) corpo proteico, (cl) corpo lipídico, (es) embrião somático, (ev) elemento de vaso, (inf) inflorescência, (mf) meristema fundamental, (pc) procâmbio e (pt) protoderme. Barras = A: 2 mm; B, C: 500 μ M; D, E: 50 μ M; F, G: 20 μ M; H: 2 μ M e I, J: 0,5 μ M.

De acordo com Joy IV *et al.* (1991) vários são os fatores que podem influenciar o padrão de deposição de reservas durante a embriogênese somática, tais como a ausência da influência maternal e as condições de cultivo, no que diz respeito ao conteúdo de água, presença de reguladores de crescimento, concentração de sais e de fonte de carbono e estabilidade do ambiente osmótico. Nesse sentido, alternativas como adição de sacarose, ácido abscísico e polietilenoglicol são relatadas para melhorar a acumulação de reservas e regular o amadurecimento de embriões somáticos (PINTO *et al.*, 2010). Etienne *et al.* (2013) sugerem também, dada a alta plasticidade de embriões somáticos com relação a determinadas funções fisiológicas como a fotossíntese, a manipulação de condições ambientais visando estimular a fotoautotrofia durante as fases iniciais do processo germinativo.

3.2 Experimento 2: Influência de diferentes auxinas e concentrações e de inflorescências com diferentes graus de maturidade na indução de calos, formação de embriões somáticos e regeneração de plantas

3.2.1 Indução de calos

Após 30 dias de cultivo em meio basal provido de altas concentrações de auxina, verificou-se que as inflorescências responderam a todos os tratamentos testados. A resposta foi caracterizada pelo intumescimento dos explantes que, de maneira geral, duplicaram de tamanho (Figura 7A).

Aos 60 dias, a oxidação foi inexpressiva e formações calogênicas incipientes foram observadas em todos os tratamentos, evidenciando o modelo indireto de embriogênese somática. Calos primários translúcidos e com bordas irregulares, semelhantes aos relatados por Zayed e Elbar (2015) em inflorescências imaturas de *Phoenix dactylifera*, foram observados na base das ráquulas seccionadas, sob e sobre os explantes (Figura 7B). Verificou-se também diferenciação de alguns primórdios florais que adquiriram formato portiaçudo e cor branca (Figura 7B) e, em alguns tratamentos

sob efeito de 450 μM e 675 μM Picloram, observou-se intumescimento diferenciado (Figura 7C).

Aos 90 dias em meio de indução, observaram-se oxidação expressiva nos explantes em meio desprovido de regulador (Figura 7D) e leve oxidação dos explantes do estágio III de desenvolvimento. Verificaram-se amarelecimento na maioria dos explantes (Figura 7E), independente do tratamento, e desenvolvimento de alguns botões florais, sobretudo, nos explantes em estádios mais desenvolvidos (II, III). Notaram-se também algumas estruturas com formato nodular, compactas, translúcidas e com superfície lisa (Figura 7F), classificadas por Sandoval-Cancino *et al.* (2016) como estruturas embriogênicas. Tais estruturas, anatomicamente embriogênicas (ver seção 3.2.4), necrosaram com a realização dos subcultivos. Hipotetiza-se que se tratavam de embriões somáticos de origem direta que sucumbiram a longa exposição às altas concentrações de auxina ou tratavam-se apenas de primórdio florais desenvolvidos. Além dessas, visualizaram-se na maioria dos tratamentos, formações calogênicas com consistência compacta, bordas irregulares e coloração variando entre bege e branca, algumas, translúcidas geralmente desprendidas da base do explante ou verificadas sob e/ou sobre o explante (Figura 7G-I).

Incremento evidente da oxidação foi observado aos 150 dias em meio de indução de calos, principalmente, nos tratamentos sob efeito de 675 μM de Picloram e de todas concentrações de 2,4-D. Karun *et al.* (2004) também mencionaram alta taxa de oxidação sob altas concentrações de Picloram em diferentes explantes de *Areca catechu*. Já Teixeira, Siindahl e Kirby (1994) e Steinmacher, Clement e Guerra (2007) relataram altas taxas de oxidação de inflorescências sob efeito de 2,4-D de *E. guineensis* e *Bactris gasipaes*, respectivamente. Além da oxidação, foi visualizada pigmentação provável de antocianina (cor roxa) em alguns explantes, o que de acordo com Vinodhana e Ganesan (2013) pode ser um indicador de potencial embriogênico, ou ainda segundo Mousavizadeh *et al.* (2010), pode ser considerada uma consequência da exposição às condições estressantes.

A avaliação do percentual da taxa de oxidação (explantes totalmente escurecidos) e de calos primários formados foi realizada aos 180 dias de cultivo (Tabela 4). Para a variável oxidação, a interação concentração vs. estágio de desenvolvimento foi significativa (Tabela 4), bem como efeito isolado do fator auxina, com destaque para a auxina 2,4-D que promoveu, independente da concentração e estágio de

desenvolvimento do explante, uma taxa de 93,8% de oxidação, enquanto o Picloram promoveu uma taxa média de 85,0%.

De modo geral, a oxidação foi expressivamente alta em todas as concentrações, independente da auxina e, sobretudo, nos estádios mais avançados de desenvolvimento (II e III) (Tabela 4) (Figura 7J-L), o que concorda com o relato de Guerra e Handro (1991, 1998) em *Euterpe edulis*. Essa maior oxidação em explantes mais diferenciados pode ser explicada pelo maior conteúdo fenólico endógeno observado em explantes não cultivados, fato evidenciado pelas análises histoquímicas (Figura 10G, I). O seccionamento dos explantes provoca a liberação e consequente exposição desse conteúdo ao ar e às diferentes enzimas que participam do processo oxidativo (LAUKKANEN *et al.*, 1999). Menciona-se que a realização de subcultivos constantes e o uso de carvão ativado foram essenciais para manter níveis de oxidação toleráveis, os quais, inclusive, podem ter favorecido o processo de rediferenciação (ZHOU *et al.*, 2016).

Para a variável calos primários (independente da quantidade e qualidade de calos), as interações concentração *vs.* estágio de desenvolvimento e auxina *vs.* estágio de desenvolvimento foram significativas e, portanto, desdobradas (Tabela 4). As análises dos desdobramentos revelam que, de modo geral, os explantes nos estádios mais diferenciados (II e III) foram mais responsivos na maioria das concentrações testadas (desconsiderar tratamento sem auxina, dada a ausência de resposta) e independente da auxina avaliada. Ainda segundo análise dos estádios dentro de cada auxina, o Picloram promoveu igualmente calos nos três estádios de desenvolvimento testados, enquanto, o 2,4-D promoveu maior calogênese nos estádios II e III. Diante do exposto, ressalta-se que tecidos somáticos mais imaturos (estádio I) e, portanto, mais meristemáticos, provenientes de inflorescências de gueroba, não são necessariamente mais responsivos em termos de proliferação celular e consequente formação de calos iniciais (independente da quantidade e qualidade dos calos) que aqueles considerados menos imaturos (estádios II e III). Essa constatação também foi feita por Ho e Vasil (1983) em explantes foliares de *Saccharum officinarum* e por Gueye *et al.* (2009) em explantes foliares de *P. dactylifera*. De acordo com Gueye *et al.* (2009), as respostas às auxinas exógenas dependem de um conjunto de fatores que incluem níveis endógenos de auxinas, fisiologia inicial e estado de diferenciação dos explantes.

Já conforme o desdobramento das auxinas dentro de cada estágio, o Picloram foi mais eficiente na produção de calos primários nos explantes em estágio menos

diferenciado de desenvolvimento (I) em comparação ao 2,4-D, enquanto que, o 2,4-D foi mais eficiente na produção de calos primários nos explantes no estágio mais diferenciado de desenvolvimento (III) em comparação ao Picloram.

Tabela 4. Efeito das auxinas Picloram e 2,4-D em diferentes concentrações e de três estádios de desenvolvimento de explantes sobre as percentagens de oxidação e de calos primários, durante a embriogênese somática de gueroba (*Syagrus oleracea*), a partir de inflorescências imaturas

Estádios de desenvolvimento	Oxidação (%)			
	0 µM	225 µM	450 µM	675 µM
I	100,0 ± 0,0 aA	50,0 ± 10,8 cB	58,3 ± 9,9 bB	93,3 ± 5,1 aA
II	100,0 ± 0,0 aA	85,0 ± 7,0 bA	96,6 ± 3,3 aA	96,6 ± 3,4 aA
III	100,0 ± 0,0 aA	100,0 ± 0,0 aA	100,0 ± 0,0 aA	93,3 ± 5,1 aA
Estádios de desenvolvimento	Calo primário (%)			
	0 µM	225 µM	450 µM	675 µM
I	0,0 ± 0,0 aB	60,0 ± 10,4 aA	58,3 ± 9,3 bA	50,0 ± 10,3 bA
II	0,0 ± 0,0 aA	76,6 ± 4,8 aA	88,3 ± 4,5 aA	85,0 ± 5,8 aA
III	0,0 ± 0,0 aA	90,0 ± 4,6 aA	85,0 ± 4,3 aA	85,0 ± 7,8 aA
Estádios de desenvolvimento	Calo primário (%)			
	Picloram	2,4-D		
I	48,3 ± 12,2 aA	35,83 ± 9,6 bB		
II	63,3 ± 17,9 aA	61,6 ± 11,5 aA		
III	56,6 ± 11,1 aB	73,3 ± 12,5 aA		

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os estádios de desenvolvimento em cada concentração ou em cada regulador de crescimento e letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as concentrações ou entre os reguladores de crescimento, dentro de cada estágio de desenvolvimento, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. ± Erro padrão

Aos 240 dias em meio de indução foi avaliada a percentagem de formação de calos totalmente embriogênicos ou com características embriogênicas (a partir do número inicial de calos primários), ou seja, calos capazes de formar embriões somáticos (Tabela 5). Em termos morfológicos esses calos apresentavam consistência compacta, superfície irregular, ausência de formato definido (Figura 7J) e anatomicamente eram semelhantes aos descritos na seção 3.1.4 (Figura 5F). Alguns deles também exibiam formato nodular, cobertura levemente hidratada e centro compacto (Figura 7K) (com zona meristemática bem definida – ver seção 3.2.4, Figura 11F-G). Todos os calos supracitados exibiam coloração variando entre branco e bege. Menciona-se que o tempo necessário para a formação de estruturas embriogênicas a partir de inflorescências

joventes de gueroba foi relativamente curto quando comparado ao relatado em *E. guineensis* por Teixeira, Sondahl e Kirby (1994), os quais necessitaram de 81 semanas (567 dias).

Vale ressaltar que, nesse período, verificou-se também uma transição das formas calogênicas primárias para calos predominantemente mucilaginosos (hidratados, aquosos) e coloração marrom (em função da oxidação), notadamente, em explantes nos estádios II e III de desenvolvimento (Figura 7L).

A formação de calos embriogênicos foi observada em todas as concentrações de Picloram e 2,4-D (exceto nos tratamentos desprovidos de regulador), com destaque para o tratamento 450 µM Picloram estágio I, que proporcionou uma taxa de 60,8 % de calos embriogênicos (Tabela 5). A superioridade do Picloram durante o processo de indução embriogênica também foi mencionada por Steinmacher, Clement e Guerra (2007) em *B. gasipaes* e por Pádua *et al.* (2017) em *E. guineensis* e segundo Karun *et al.* (2004), isso se deve à efetividade na sua absorção e mobilização, bem como a sua rápida metabolização em sítios específicos.

Tabela 5. Efeito das auxinas Picloram e 2,4-D em diferentes concentrações e de três estádios de desenvolvimento de explantes sobre a percentagem de calos embriogênicos, durante a embriogênese somática de gueroba (*Syagrus oleracea*), a partir de inflorescências imaturas

Auxina	Estádio de desenvolvimento	Calo embriogênico (%)			
		Concentração (µM)			
		0	225	450	675
Pic	I	0,0 ± 0,0 aB	16,6 ± 16,6 aB	60,8 ± 14,9 aA	15,8 ± 8,2 aB
	II	0,0 ± 0,0 aA	4,1 ± 4,1 aA	0,0 ± 0,0 bA	4,1 ± 4,1 aA
	III	0,0 ± 0,0 aA	0,0 ± 0,0 aA	0,0 ± 0,0 bA	0,0 ± 0,0 aA
2,4-D	I	0,0 ± 0,0 aA	3,3 ± 3,3 aA	16,6 ± 16,6 aA	13,8 ± 9,0 aA
	II	0,0 ± 0,0 aA	9,7 ± 6,2 aA	10,0 ± 4,4 aA	0,0 ± 0,0 aA
	III	0,0 ± 0,0 aA	3,3 ± 3,3 aA	4,1 ± 4,1 aA	0,0 ± 0,0 aA

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os estádios de desenvolvimento em cada concentração e auxina e letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as concentrações, dentro de cada estágio de desenvolvimento e auxina, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. ± Erro padrão

Segundo Ronchi e Giorgetti (1995), tecidos imaturos, assim como órgãos próximos ao estágio embriogênico, quando submetidos às condições estressantes, retêm maior capacidade embriogênica e de conseqüente regeneração de plantas, dada a

capacidade de entrar diretamente na fase de reprogramação gênica; tais explantes são considerados ideais para espécies monocotiledôneas (FEHÉR, 2006). O exposto explica a superioridade embriogênica das inflorescências pertencentes ao estágio I de desenvolvimento (6; 11,5; 17 cm), dado o seu menor grau de diferenciação (ver seção 3.2.4, Figura 10A-E). A maior capacidade embriogênica de inflorescências imaturas também foi evidenciada em outras palmeiras como *E. edulis* (GUERRA; HANDRO, 1991, 1998), *A. catechu* (KARUN *et al.*, 2004), *B. gasipaes* (STEINMACHER; CLEMENT; GUERRA, 2007), *P. dactylifera* (SIDKY; ELDAWYATI, 2012) e *C. nucifera* (VERDEIL *et al.*, 1994; SANDOVAL-CANCINO *et al.*, 2016) e está associada, provavelmente, à alta concentração de AIA endógeno, como verificado por Zayed e Elbar (2015).

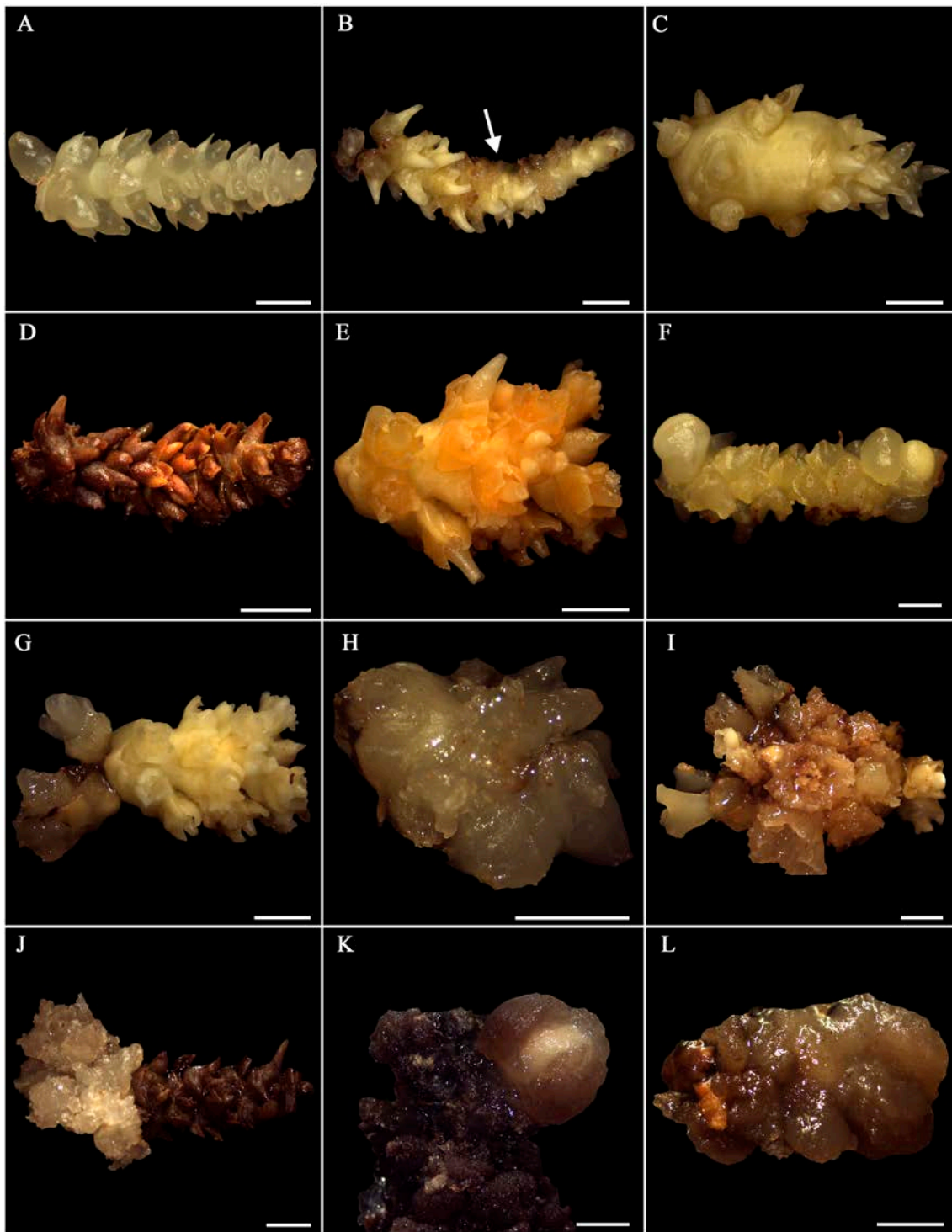


Figura 7. Estádios morfológicos da indução de calos a partir de inflorescências imaturas durante a embriogênese somática de gueroba (*Syagrus oleracea*). A: Inflorescência intumescida após 30 dias em meio com Picloram. B: Calos primários observados sobre ráquila seccionada (seta) e botões florais mais diferenciados (pontagudos e brancos) após 60 dias em meio com Picloram. C: Explante com intumescimento diferenciado após 60 dias em meio com Picloram. D: Explante com oxidação expressiva após 90 dias em meio sem auxina. E: Explante com notável amarelecimento e botões florais desenvolvidos, após 90 dias em meio com 2,4-D. F: Estruturas nodulares observadas após 90 dias em meio com 2,4-D. G, H, I: Calos primários observados em explantes após 90 dias em meio de indução. J: Calo embriogênico, compacto e com superfície

irregular observado após 240 dias em meio de indução. K: Calo nodular com características embriogênicas visualizado após 240 dias em meio de indução. L: Calo mucilaginoso observado após 240 dias em meio de indução. Barras = A: 1 mm e B- L: 2 mm.

3.2.2 Diferenciação e maturação de embriões somáticos

Os calos com características embriogênicas formados no meio de indução foram transferidos para meios contendo baixas concentrações de auxinas, visando à conversão dos calos embriogênicos em embriões somáticos. Aos 30 dias em meio de diferenciação (40 μM), observou-se o desenvolvimento de estruturas globulares e translúcidas, caracterizando embriões somáticos em fase semelhante a globular (Figura 8A-C). *Clusters* de embriões somáticos fusionados, alguns em fase mais avançada de desenvolvimento e coloração esbranquiçada também foram observados (Figura 8D).

Aos 150 dias em meio de diferenciação, após a redução contínua e mensal da concentração (40 μM , 10 μM , 5 μM , 1 μM) das auxinas utilizadas (Tabela 2), realizou-se a avaliação do número de embriões somáticos formado por tratamento (Figura 9). A interação tripla não foi significativa, verificando-se somente diferenças entre os estádios de desenvolvimento testados, com destaque para estágio I (menos diferenciado) que proporcionou um valor médio de 2,0 embriões somáticos e um total de 97 embriões somáticos. Esse resultado confirma a efetividade da utilização de tecidos mais meristemáticos na embriogênese somática, principalmente, em monocotiledôneas, como previamente salientado por Fehér (2006).

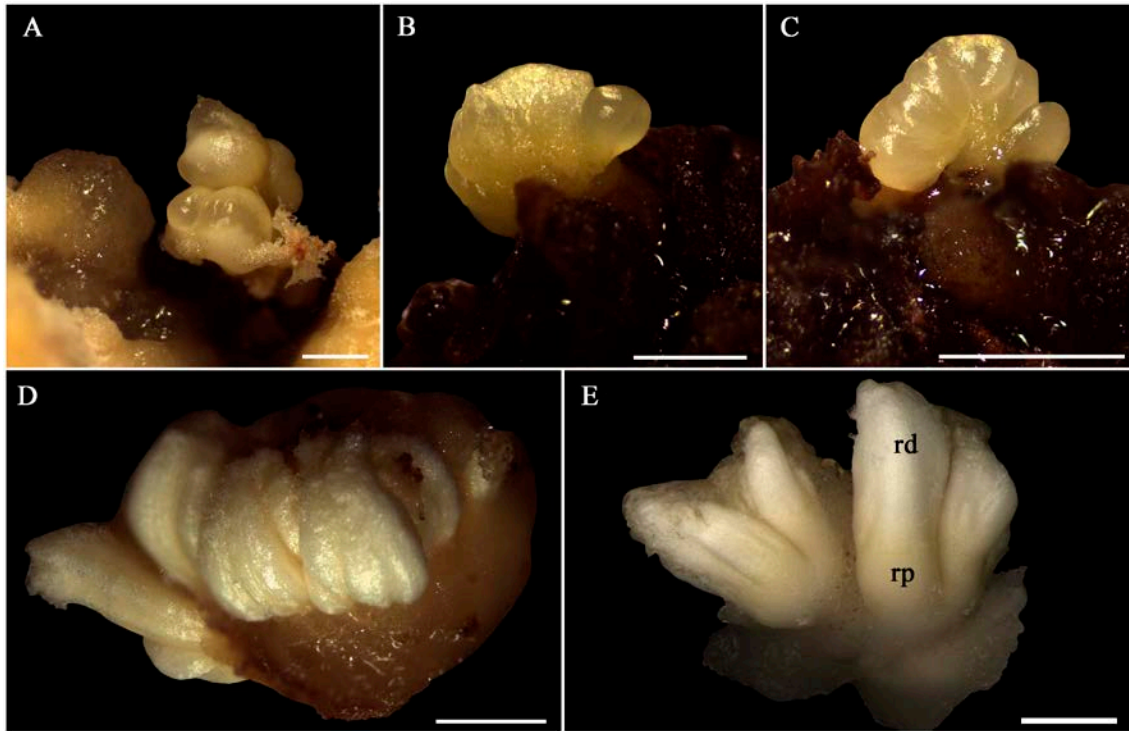


Figura 8. Diferenciação de embriões somáticos a partir de inflorescências imaturas durante a embriogênese somática de guero (*Syagrus oleracea*). A-C: Embriões somáticos em fase semelhante ao globular. D: *Clusters* de embriões somáticos fusionados. E: Alongamento de embriões somáticos; notar regiões distal e proximal com colorações distintas. Abreviações: (eg) embrião globular, (rd) região distal e (rp) região proximal. Barras = A, B: 1 mm e C-E: 2 mm.

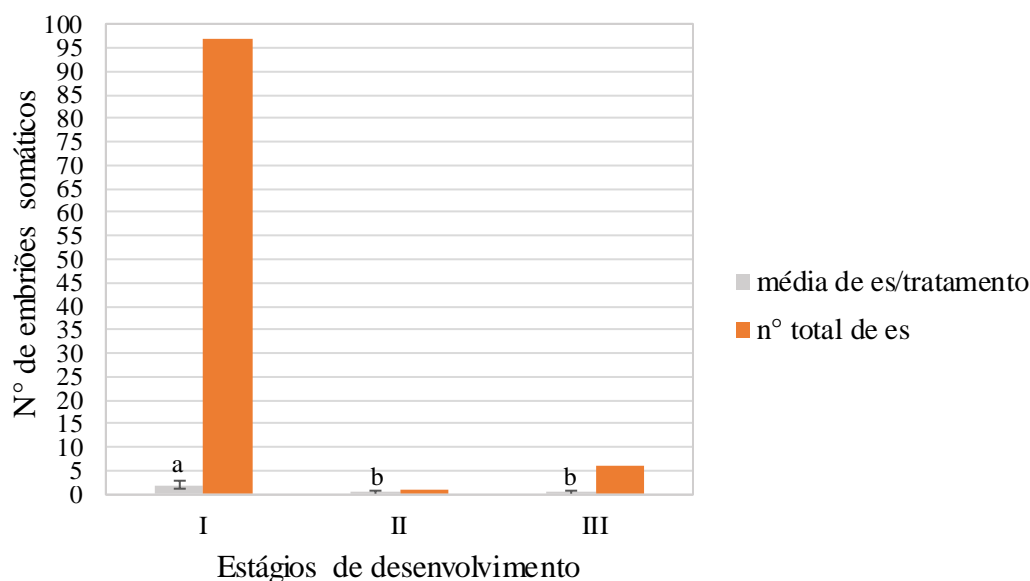


Figura 7. Número médio e total de embriões somáticos observados aos 150 dias em meio de diferenciação, durante a embriogênese somática em gueroba (*Syagrus oleracea*), a partir de três diferentes estádios de maturação (estádios I, II e III) de inflorescências imaturas. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam o erro padrão. Barras representam o erro padrão.

Aos 180 dias, especificamente em meio com 0,45 μM , verificou-se o desenvolvimento de mais calos nodulares com superfície mucilagínosa e centro compacto, além do alongamento de alguns embriões somáticos, inclusive, com coloração das regiões distal (coloração branca) e proximal (coloração amarelada) (Figura 8E) semelhante ao observado em embriões zigóticos da espécie. Vale mencionar que foi possível visualizar *clusters* com embriões somáticos em diferentes estádios, o que evidencia a assincronia do processo (Figura 10G, H), característica comum em vários outros sistemas embriogênicos em palmeiras (LEDO *et al.*, 2002; KARUN *et al.*, 2004; STEINMACHER; CLEMENT; GUERRA, 2007; SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2010; BALZON; LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2013; LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2014; EL BAR; EL DAWAYATI, 2014; PÁDUA *et al.*, 2017). Já em meio com 0,045 μM , notou-se a formação de uma massa de células mucilagínosa na base de alguns *clusters* de embriões somáticos fusionados.

3.2.3 Regeneração de plantas

Aos 30 dias em meio de regeneração, notou-se desfusão e esverdeamento de alguns embriões somáticos. Aos 60 dias, observaram-se diferentes respostas, inclusive, surgimento de novos embriões somáticos globulares; embriões somáticos com formato semelhante ao estágio torpedo, com diferentes tamanhos; embriões somáticos com desenvolvimento somente da região haustorial e embriões somáticos com alongamento expressivo do pecíolo cotiledonar, alguns com emissão de raiz. As diferentes respostas mencionadas ratificam o caráter assicrônico do processo embriogênico, algumas delas verificadas em um mesmo *cluster* (Figura 10).

O processo de alongamento do pecíolo cotiledonar foi observado aos 90 dias em meio de regeneração em alguns embriões somáticos, indicando início do processo germinativo (RIBEIRO; OLIVEIRA; GARCIA, 2012; MAGALHÃES *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013), relacionado ao alongamento do eixo embrionário, o que é considerado indicativo de sucesso do processo germinativo zigótico (BEWLEY; BLACK, 1994). Vale mencionar que alguns *clusters* embriogênicos, principalmente, aqueles nitidamente fusionados, com a permanência no meio de regeneração, oxidaram seguido ou em paralelo ao processo de necrose.

O processo germinativo foi consideravelmente lento, com desenvolvimento inicial de raiz e haustório e desenvolvimento ausente da parte aérea na maioria dos embriões obtidos, indícios, de acordo com Yeung (1995), Gray *et al.* (1995) e Kärkönen (2000), de germinação precoce e consequentes problemas na maturação.

Hipotetiza-se que a regeneração limitada observada nesse experimento está associada com a ocorrência de anormalidades, como fusão marcante (Figuras 10I-K; 13F, G e 14A-D), com a ocorrência de germinação precoce e com o déficit de reservas, como proteínas, necessárias ao processo germinativo (comprovado por análises histoquímicas). A produção deficitária de proteínas não é uma característica limitada a embriões somáticos de *S. oleracea*, com vários outros relatos em palmeiras como *P. dactylifera* (SANÉ *et al.*, 2006; SGHAIER *et al.*, 2008), *E. guineensis* (ABERLENC-BERTOSSI *et al.*, 2008) e *A. aculeata* (MOURA; VENTRELLA; MOTOIKE, 2010). Embriões somáticos fusionados e ausência de sinais de maturação também foram relatados por Steinmacher *et al.* (2011) em *B. gasipaes*.

Conforme Sghaier *et al.* (2008), a baixa taxa de compostos de reserva pode ser consequência da ausência de sinais indutores, como hormônios e dessecação, essenciais

para estimulação da síntese de moléculas específicas. Essa problemática corriqueira relacionada às substâncias de reserva levanta a necessidade de otimização de protocolos de maturação em palmeiras, os quais de acordo com Ree e Guerra (2015), ainda permanecem pouco estudados.

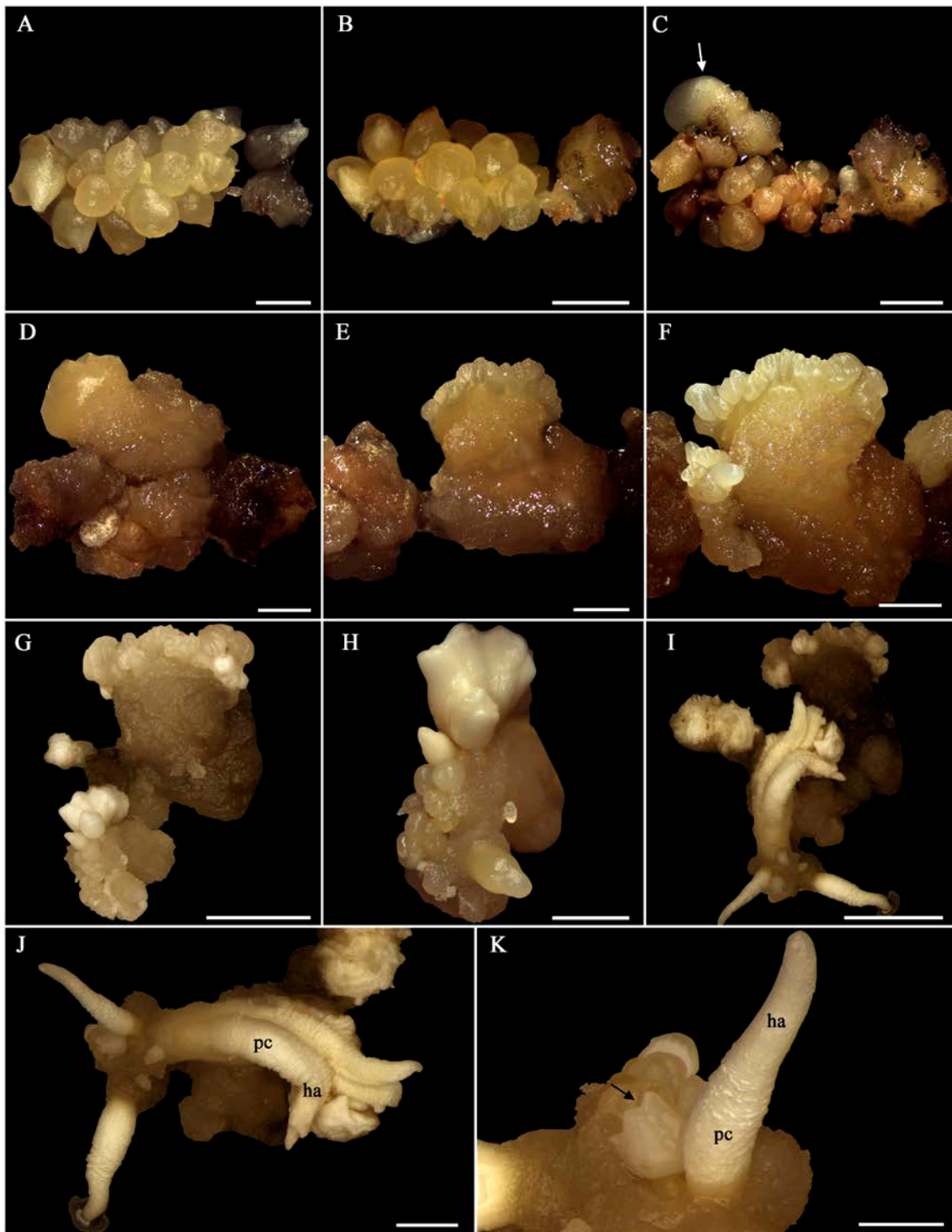


Figura 10. Evolução morfológica do calo primário a embriões somáticos de guero (*Syagrus oleracea*) a partir de inflorescência imatura (estádio I). A, B: Formações calogênicas incipientes verificadas na base da ráquila aos 60 e 120 dias, respectivamente, em meio de indução com 675 μ M de Picloram. C: Início de oxidação e formação de calo nodular compacto (seta) aos 240 dias em meio de indução. D: Desenvolvimento de massa calogênica mucilaginosa sobre todo o explante e de calo nodular compacto que adquiriu coloração amarela aos 60 dias em meio de diferenciação com 10 μ M de Picloram. E: Formação de *cluster* de embriões somáticos globulares translúcidos aos 90 dias em meio de diferenciação com 5 μ M de Picloram. F:

Desenvolvimento de *clusters* de embriões somáticos, inclusive, alguns com início de alongamento, aos 120 dias em meio de diferenciação com 1 μM de Picloram. G, H: Aquisição de coloração branca e alongamento mais evidente de embriões somáticos, aos 180 dias em meio de diferenciação com 0,45 μM de Picloram (notar assincronia do processo). I, J: Embriões somáticos com evidente alongamento do pecíolo cotiledonar; notar fusionamento. K: Detalhe da letra J; notar fusionamento (seta). Abreviações: (ha) haustório e (pc) pecíolo cotiledonar. Barras = A: 1 mm; B, C, D, E, F, H, J, K: 2 mm e G, I: 5 mm.

3.2.4 Análises anatômica e histoquímica

Visando a melhor compreensão dos eventos subjacentes ao processo, realizaram-se análises anatômicas e histoquímicas das inflorescências imaturas (tempo 0) utilizadas como explantes durante embriogênese somática de gueroba (Figura 10), bem como dos calos primários, calos embriogênicos (Figuras 12, 13B, C) e embriões somáticos obtidos (Figuras 13-15).

Como observado na Figura 10A e B, as inflorescências oriundas do estágio I, de modo geral, são caracterizadas pela presença de vários primórdios florais (meristemas florais) envoltos por brácteas florais, consequentes de divisões celulares na periferia das ráquias. Algumas brácteas florais não contêm primórdios florais. Esses primórdios são caracterizados como áreas formadas por células pequenas, com alta relação núcleo citoplasma e em intensa divisão celular (Figura 11C). As ráquias também exibem cordões procambiais conspícuos, alguns com elementos de vaso diferenciados (Figura 11D, E). Segundo as análises histoquímicas, vários grãos de amido foram identificados com reagente Lugol ao longo de toda a extensão da ráquila, sobretudo, entre os feixes vasculares (Figura 11E).

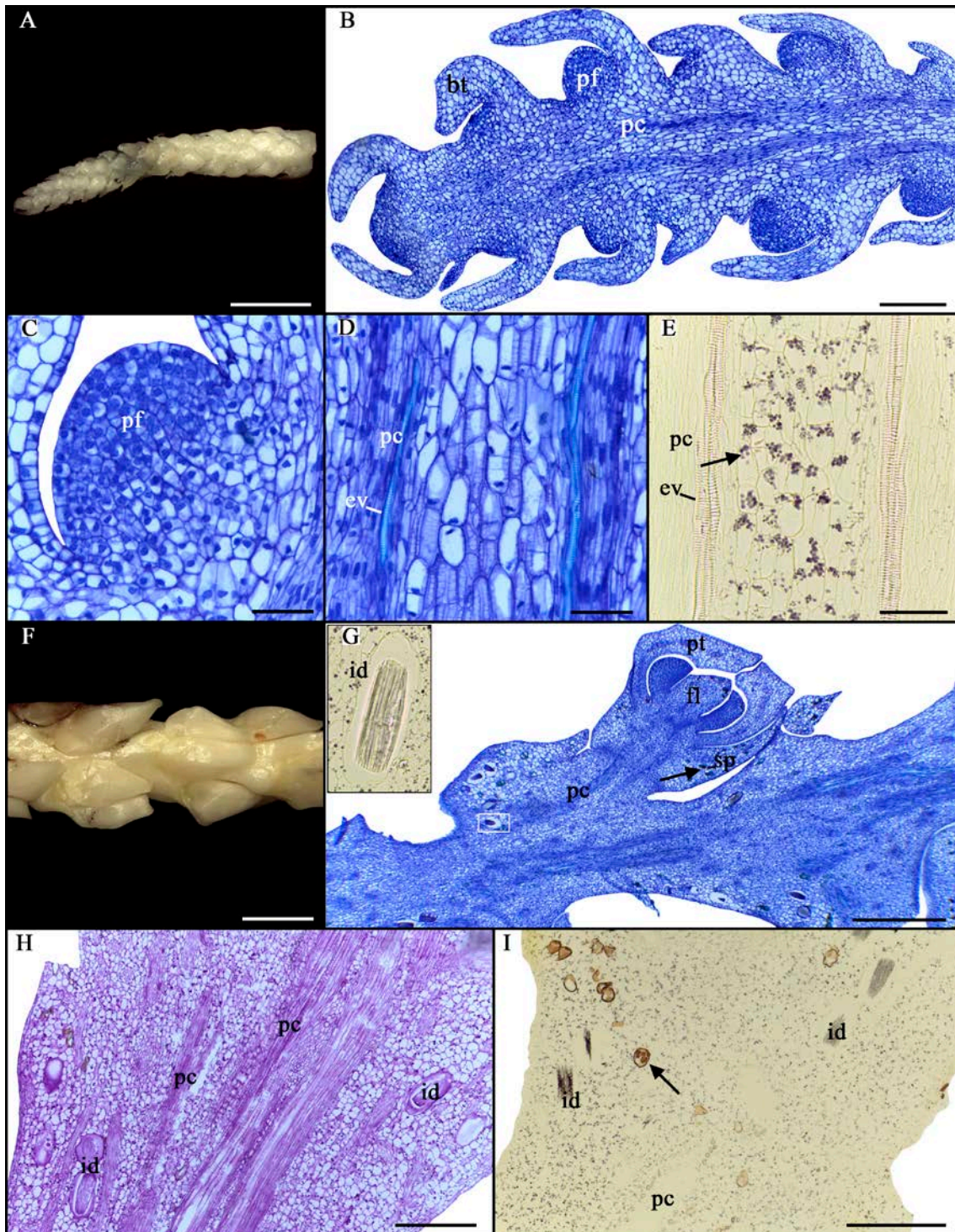


Figura 11. Descrição morfoanatômica de inflorescências imaturas de gueroba (*Syagrus oleracea*) não cultivadas *in vitro*. A: Inflorescência pertencente ao estágio I de desenvolvimento. B: Secção anatômica longitudinal da inflorescência mencionada na letra A. C: Detalhe de primórdio floral. D: Detalhe de feixe vascular; notar elementos de vaso. E: Presença de grãos de amido conspícuos entre tecidos vasculares visualizados com reagente Lugol. F: Inflorescência pertencente ao estágio III de desenvolvimento. G: Secção anatômica longitudinal da inflorescência mencionada na letra F; observar idioblátos com ráfides (quadrados) e compostos fenólicos (seta). H, I: Presença de grãos de amido conspícuos ao longo de todo o tecido (reagentes PAS e Lugol,

respectivamente); atentar-se para feixe vascular, idioblastos e compostos fenólicos (corados de marrom dourado – Letra I). Abreviações: (bc) bráctea, (ev) elemento de vaso, (fl) flor, (id) idioblasto, (pc) procâmbio, (pf) primórdio floral, (pt) pétala e (sp) sépala. Barras = A, F: 2 mm; B, G: 500 µm; C- E: 50 µm e H, I: 200 µm.

Já as inflorescências do estágio III (Figura 11F, G) são histologicamente mais diferenciadas, caracterizadas pela presença de diferentes verticilos florais, como sépalas, pétalas, androceu e gineceu. Além de cordões procambiais e elementos de vaso diferenciados, as ráquulas apresentam vários idioblastos com ráfides (Figura 11G-I). As análises histoquímicas revelaram, por meio de coloração com reagentes PAS (Figura 11H) e Lugol (Figura 11I), similar ao observado em inflorescência pertencente ao estágio I (Figura 11E), a presença de inúmeros grãos de amido distribuídos ao longo de toda a extensão da ráquila, exceto nas regiões vasculares. Compostos fenólicos também foram observados (Figura 11G, I).

As análises anatômicas revelaram já aos 60 dias em meio de indução, formações calogênicas incipientes oriundas de divisões de células mais externas de botões florais já diferenciados (explantes provenientes do estágio I) (Figura 12A-C). Essas formações exibiam citoplasma denso, núcleos volumosos, nucléolos proeminentes, vacúolos, quando presentes, fragmentados (pequenos) e intensa divisão celular, ou seja, características típicas de células meristemáticas (Figura 12B, C). Origem de calos a partir de tecidos mais externos (epidérmicos e subepidérmicos) também foi relatada por Botti e Vasil (1984) em inflorescências imaturas de *Pennisetum americanum* e Zayed e Elbar (2015) em inflorescências imaturas de *P. dactylifera*.

Aos 90 dias, notou-se a formação de estruturas embriogênicas nodulares, compactas e translúcidas a partir do meristema floral (Figura 12D). Tais estruturas exibiam uma zona meristemática periférica envolta por uma camada de células semelhante a uma protoderme em formação e exibiam uma zona mais interna composta por células tipicamente parenquimáticas. A zona meristemática apresentava células com padrão de divisão periclinal. Sinais de divisão celular também foram observados na camada semelhante à protoderme (Figura 12E). Essas estruturas, com a realização dos subcultivos constantes necrosaram. Há duas possíveis hipóteses para explicar o que seriam tais estruturas: i) tratavam-se de embriões somáticos de origem direta e multicelular (desenvolvidos a partir dos primórdios florais), cujo o desenvolvimento foi prejudicado pela manutenção em meio com altas concentrações de auxina ou ii) tratavam-se apenas de primórdios florais com atividade meristemática incrementada

dado o maior aporte externo de auxina. As análises histoquímicas dessas estruturas evidenciaram grãos de amido na região periférica em intensa divisão celular, provavelmente, suprindo energeticamente essas divisões (Figura 12E). Sandoval-Cancino *et al.* (2016) descreveram em *C. nucifera* estruturas morfoanatomicamente muito semelhantes às supracitadas, as quais foram referidas pelos autores como estruturas embriogênicas.

Calos totalmente embriogênicos ou com características embriogênicas foram visualizados aos 240 dias em meio de indução (Figura 13F). Anatomicamente esses calos eram compostos completa ou predominantemente por células com características meristemáticas, além de grãos de amido evidentes (Figura 13G). Visualizaram-se também calos mucilaginosos (hidratados, aquosos) e com coloração marrom (alta oxidação) (Figura 13H), notadamente, em explantes nos estádios mais diferenciados (II e III). Em termos histológicos, tais formações calogênicas eram formadas basicamente por células vacuoladas, com pouco conteúdo citoplasmático ou ausente e grandes espaços intercelulares ricos em pectina, dada a coloração arroxeada observada em Azul de Toluidina (Figura 13I, J); portanto, calos sem potencial embriogênico.

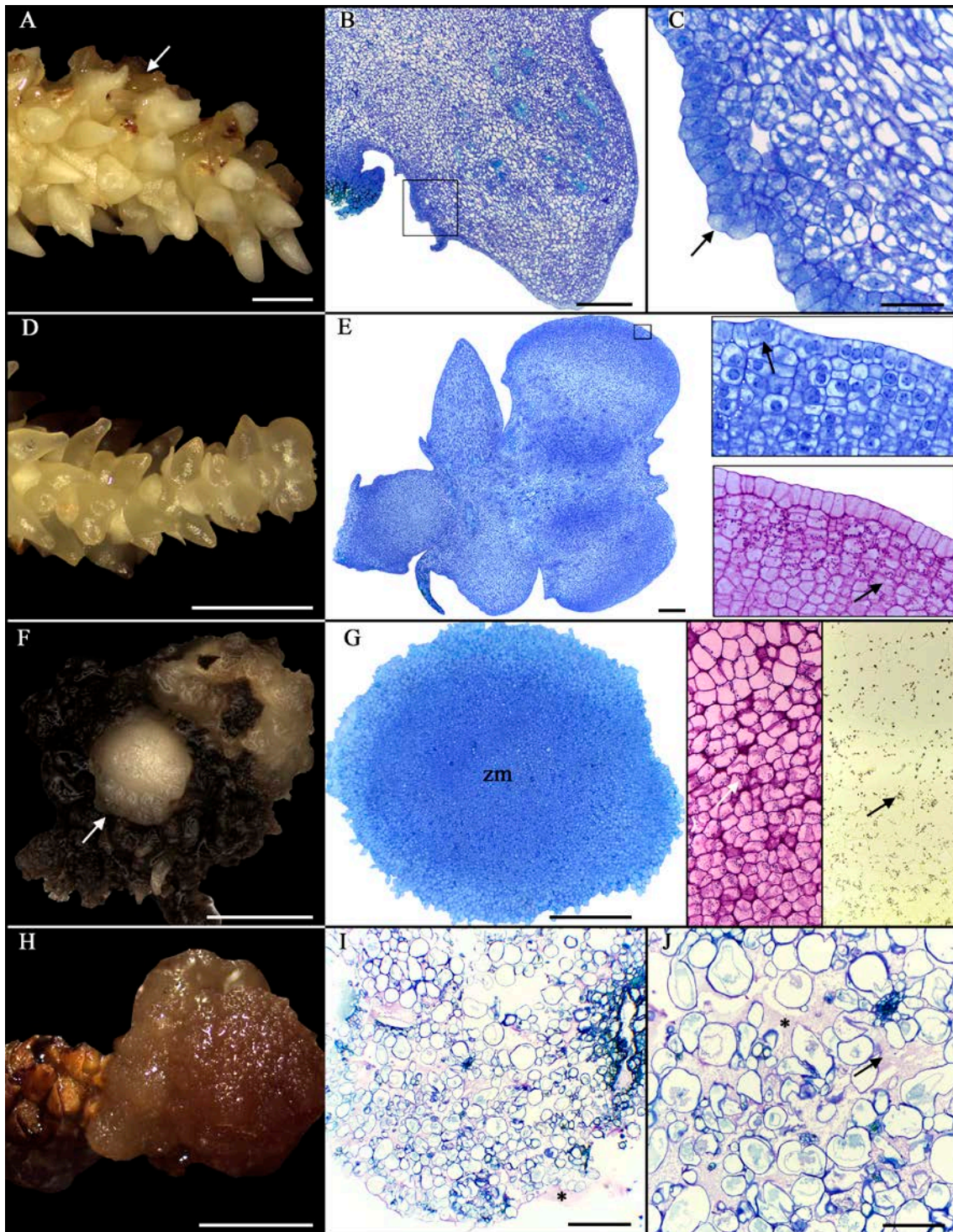


Figura 12. Análise morfoanatômica das diferentes respostas de inflorescências imaturas de gueroba (*Syagrus oleracea*) submetidas ao processo de embriogênese somática. A: Calos primários observados sobre botões florais aos 60 dias em meio de indução. B: Secção anatômica longitudinal de botão floral com início de calo a partir de células externas. C: Magnificação do corte anatômico anterior; notar células em divisão celular. D: Estruturas nodulares embriogênicas observadas aos 90 dias de cultivo em meio de indução. E: Secção anatômica longitudinal de estruturas nodulares embriogênicas; notar zona meristemática periférica com células se dividindo periclinalmente (pontilhado) e camada semelhante à protoderme com células em divisão celular (seta). O reagente PAS

revelou grãos de amido na região periférica (seta). F: Calo embriogênico observado aos 240 dias em meio de indução. G: Secção anatômica do calo embriogênico com zona meristemática proeminente; observar grãos de amido (reagentes PAS e Lugol, respectivamente). H: Calo não embriogênico observado aos 240 dias em meio de indução. I, J: Secção anatômica de calo não embriogênico; atentar-se à coloração roxa entre células (*). Barras = F: 5 mm; C: 1 mm; A, H: 2 mm; B, G, I: 500 μ M e D, J: 200 μ M.

Embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento foram analisados histológica e histoquimicamente. Embriões somáticos em estágio globular caracterizados morfológicamente como estruturas ora translúcidas ora brancas, com superfície lisa e brilhosa (Figura 13A) e anatomicamente por protoderme proeminente, células com paredes celulares delgadas, vacuolação variável, ausência de espaços intercelulares (Figura 13B, D, E) foram observados aos 30 dias em meio de diferenciação. Na base de alguns embriões somáticos globulares visualizaram-se calos embriogênicos (Figura 13B, C).

Foram observados também embriões somáticos em estágio mais avançado de desenvolvimento caracterizados por presença de protoderme e cordões procambiais com alguns elementos de vaso em diferenciação, alguns com protoderme fusionada (Figuras 13F-I e 14A-D). Alguns desses embriões exibiam também na região proximal zonas meristemáticas bem evidentes, provavelmente, promeristemas apicais em formação (Figura 13G).

A ocorrência de fusão certamente está relacionada à provável origem multicelular dos embriões somáticos. Essa origem é hipotetizada em função da ausência de proembriões e de estruturas semelhantes a suspensores, da ocorrência de fusão e da aparente quebra de massas meristemáticas com aquisição posterior de protoderme. Canhoto e Cruz (1996) também mencionaram a ocorrência de anormalidades durante a embriogênese somática de *Feijoa sellowiana*, especificamente a ocorrência de fusão, similar em termos anatômicos ao relatado aqui. Estômatos na protoderme unisseriada também foram visualizados em alguns embriões somáticos (Figura 13H), característica comum em embriões zigóticos de algumas palmeiras (RIBEIRO; OLIVEIRA; GARCIA, 2012; GENOVESE-MARCOMINI; MENDONÇA; CARMELLO-GUERREIRO, 2013; SILVA *et al.*, 2014).

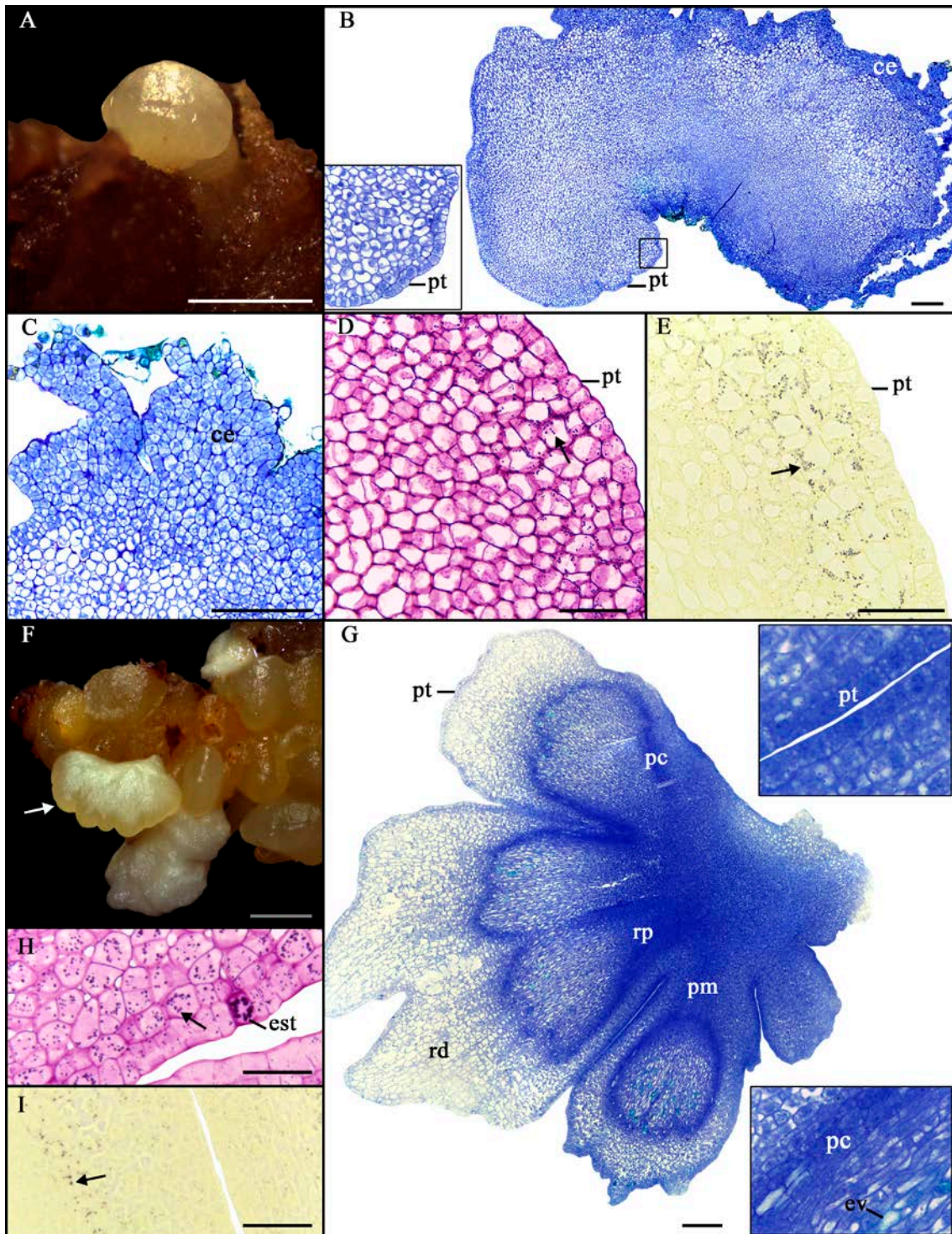


Figura 13. Caracterização morfoanatômica e histoquímica de embriões somáticos provenientes de inflorescências imaturas de gueroba (*Syagrus oleracea*). A: Embriões somáticos globulares observados aos 30 dias em meio de diferenciação. B: Secção anatômica de embrião globular com protoderme definida e calo embriogênico na base. C: Detalhe de calo embriogênico. D, E: Grãos de amido (setas) corados com reagentes PAS e Lugol, respectivamente. F: Embriões somáticos em estágio mais avançado de desenvolvimento observados aos 30 dias em meio de diferenciação. G: Secção anatômica de embriões somáticos com protoderme, cordões procambiais evidentes e promeristemas em formação; notar elementos de vaso diferenciados e fusional da

protoderme. H, I: Grãos de amido (setas) corados com reagentes PAS e Lugol, respectivamente; atentar-se para estômato (Letra H). Abreviações: (ce) calo embriogênico, (est) estômato, (ev) elemento de vaso, (pm) promeristema, (pt) protoderme, (rd) região distal e (rp) região proximal. Barras = A, F: 1 mm; B, G: 200 μ M e D, E, H, I: 50 μ M.

Segundo as análises histoquímicas, corpos proteicos não foram identificados com corante XP em nenhum dos embriões somáticos obtidos, enquanto grãos de amido, corados com reagentes PAS e Lugol, foram visualizados dispersos no meristema fundamental de alguns embriões somáticos (Figura 13D, E, H, I), inclusive em alta concentração nas células-guardas de estômatos (Figura 13H). A presença de grãos de amido também foi mencionada em embriões somáticos de *Acrocomia aculeata* (MOURA; VENTRELLA; MOTOIKE, 2010), porém, em quantidades irrisórias. Compostos fenólicos também foram identificados em alguns embriões somáticos (Figura 14B, C, F, G).

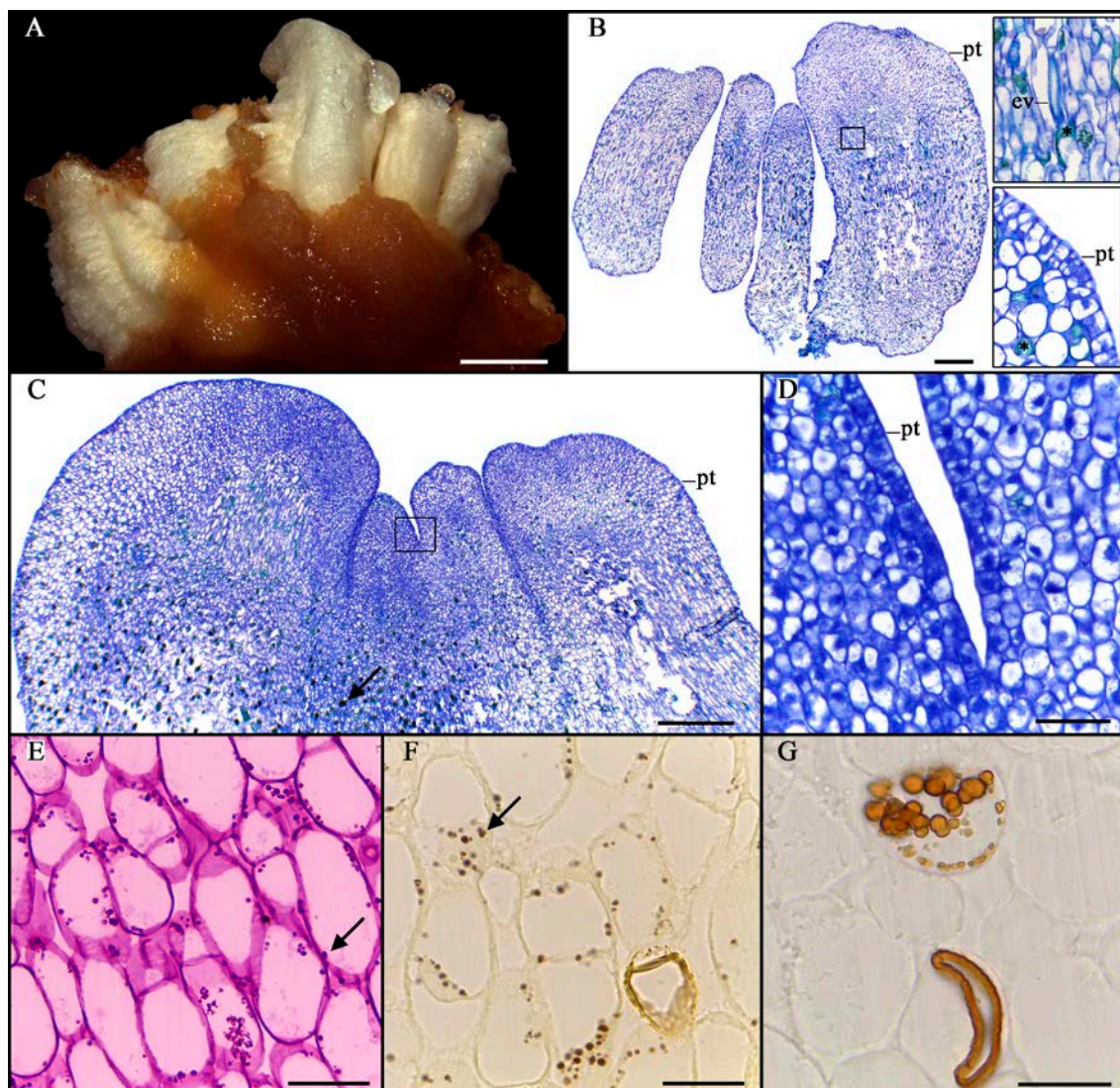


Figura 14. Caracterização morfoanatômica e histoquímica de embriões somáticos fusionados provenientes de inflorescências imaturas de guero (*Syagrus oleracea*) visualizados aos 30 dias em meio de diferenciação. A: Embriões somáticos fusionados. B: Secção anatômica longitudinal inicial de embriões somáticos fusionados; detalhe de elementos de vaso, protoderme e compostos fenólicos (*). C: Secção anatômica longitudinal de embriões somáticos evidenciando fusão de protodermes; observar compostos fenólicos (seta). D: Detalhe da protoderme fusionada (quadrado - letra C). E, F: Grãos de amido (setas) dispersos no meristema fundamental (reagentes PAS e Lugol, respectivamente); observar compostos fenólicos (letra F). G: Compostos fenólicos corados com Dicromato de Potássio. Abreviações: (ev) elemento de vaso e (pt) protoderme. Barras= A: 2 mm; B, C: 500 μ M; D: 50 μ M e E-G: 20 μ M.

Alongamento do pecíolo cotiledonar de alguns embriões somáticos foi observado aos 90 dias em meio de regeneração, semelhante ao observado em embriões zigóticos de guero (*Syagrus oleracea*) (Figura 15A). Conforme as análises histológicas, embriões somáticos com pecíolo cotiledonar alongado são totalmente diferenciados, com protoderme, procâmbio sem conexão com o explante (Figura 15C) e eixo embrionário

desenvolvido (bipolar) (Figura 15D), esse último evento é considerado um dos mais significativos da embriogênese, já que a subsequente germinação depende do desenvolvimento de um normal e funcional meristema (YEUNG, 1995). O eixo embrionário é provido de plúmula caracterizada pelo promeristema apical caulinar, primórdios foliares (Figura 15D, E) e meristema fundamental (Figura 15D) e eixo hipocótilo-radícula (Figura 15D) composto por promeristema apical radicular (Figura 15F), meristema fundamental e procâmbio (Figura 15D). Ambos promeristemas, caulinar e radicular, são compostos por células meristemáticas, ou seja, pequenas e com alta relação núcleo citoplasma (intensamente coradas com Azul de Toluidina). Todas as características supramencionadas confirmam as similaridades com embriões zigóticos de gueroaba e de outras palmeiras (RIBEIRO; OLIVEIRA; GARCIA, 2012; GENOVESE-MARCOMINI; MENDONÇA; CARMELLO-GUERREIRO, 2013; MAGALHÃES *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2014).

O alongamento do pecíolo cotiledonar foi acompanhado pelo alongamento do eixo embrionário (Figura 15D), evento similar ao descrito durante a germinação de embriões zigóticos de *A. aculeta* (RIBEIRO; OLIVEIRA; GARCIA, 2012) e *Butia capitata* (MAGALHÃES *et al.*, 2013). Embriões somáticos de gueroaba obtidos a partir de inflorescências imaturas embora morfoanatomicamente semelhantes aos embriões zigóticos da espécie (Figura 15; ver Capítulo II, seção 3.4), se diferenciam em termos histoquímicos, dada a total ausência de reservas proteicas (reservas não identificadas por meio das análises histoquímicas).

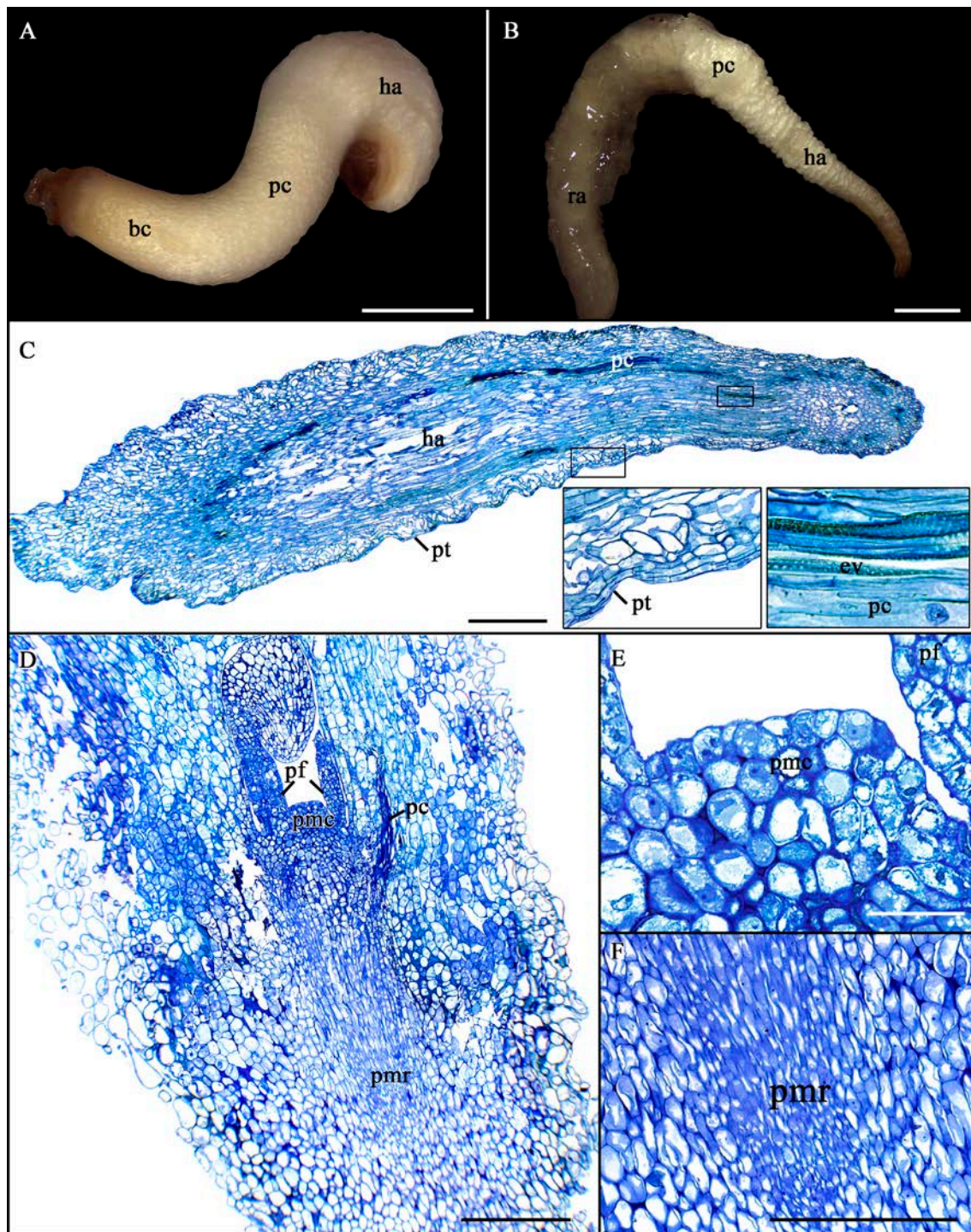


Figura 15. Aspectos morfoanatômicos de embriões de gueroba (*Syagrus oleracea*). A: Embrião zigótico de gueroba com início de alongamento do pecíolo cotiledonar. (B) Embrião somático de gueroba, proveniente de embriogênese somática indireta a partir inflorescência imatura, com haustório, alongamento de pecíolo cotiledonar e raiz. C: Secção anatômica longitudinal da região haustorial de embrião somático com pecíolo cotiledonar alongado (não corresponde ao embrião exposto na letra B); notar protoderme e procâmbio. D: Secção anatômica longitudinal do eixo embrionário em germinação de embrião somático; observar plúmula (primórdios foliares e promeristema caulinar) e eixo hipocótilo-radícula (procâmbio e promeristema radicular). E: Detalhe da secção anatômica anterior evidenciando o promeristema caulinar. F: Detalhe da

secção anatômica (letra D) evidenciando o promeristema radicular. Abreviações: (bc) bainha cotiledonar, (ev) elemento de vaso, (ha) haustório, (pc) procâmbio, (pf) primórdio foliar, (pt) protoderme, (pmc) promeristema caulinar, (pmr) promeristema radicular e (ra) raiz. Barras= A: 0,6 mm; B: 2 mm; C, D, F: 500 µM e E: 50 µM.

Como já discutido no Experimento 1 (secção 3.1.4), a ausência de reservas, especificamente proteínas, em embriões somáticos em estágio de desenvolvimento mais avançado está em concordância com outros trabalhos em palmeiras como *Calamus merrillii* e *C. subinermis* (GOH *et al.*, 2001) e *P. dactylifera* (SANÉ *et al.*, 2006) e evidencia a necessidade de otimização futura da etapa de maturação, de modo a garantir a germinação/conversão adequada dos embriões somáticos obtidos.

3.3 Experimento 3: Influência de diferentes explantes provenientes de flores femininas maduras na indução de calos

3.3.1 Indução de calos

Após sete dias em meio de indução, verificaram-se intumescimento expressivo dos explantes seccionados (flores pistiladas e carpelos), além de desprendimento de peças florais (sépalas e pétalas) de flores pistiladas seccionadas longitudinalmente, o que ocasionou em alguns explantes a exposição do carpelo também intumescido. A oxidação foi notável nos explantes testemunhas (flores pistiladas fechadas) e quase nula nos demais explantes.

Aos 30 dias de cultivo, observaram-se incremento da oxidação nos três tipos de explantes testados (Figura 17A, B) e formações calogênicas incipientes nos carpelos repartidos longitudinalmente (Figura 17B). Aos 60 dias, calos primários também foram observados nos demais explantes. A formação de calos foi relativamente rápida, apesar da maturidade dos explantes utilizados e em contraste ao relatado Zayed *et al.* (2016) em flores maduras de *P. dactylifera*, que só observaram formações calogênicas entre 84 e 112 dias em meio de indução.

A avaliação do percentual da taxa de oxidação (explantes totalmente escurecidos) e de calos primários formados foi realizada aos 180 dias de cultivo. Para a variável oxidação, não foram verificadas diferenças estatísticas entre os tratamentos testados, com taxa média de oxidação de 75% (Figura 16). Embora alta, a oxidação não foi um fator limitante à produção de calos, como discutido a seguir.

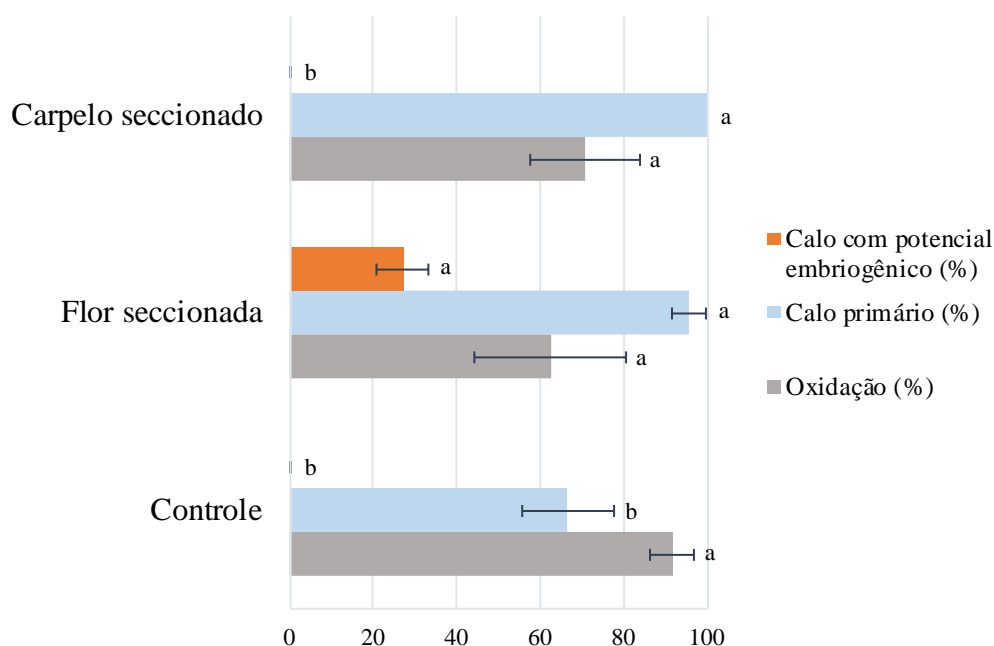


Figura 16. Oxidação, formação de calos primários e de calos com potencial embriogênico durante a embriogênese somática em gueroba (*Syagrus oleracea*), a partir de três diferentes explantes provenientes de flores femininas maduras. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam o erro padrão.

Para a variável calos primários, os explantes seccionados longitudinalmente (carpelo e flor pistilada) exibiram alta taxa de produção de calos, 100% e 95,8%, respectivamente (Figura 16). Morfologicamente, três diferentes tipos de calos primários foram notados: esponjoso branco (Figura 17C, E) e mucilaginoso (hidratado, aquoso) (Figura 17F, H), notadamente observados sobre os carpelos repartidos, e calo compacto com superfície irregular, coloração variando entre branco e bege, distribuído sobre as peças florais (sépalas e pétalas) das flores pistiladas seccionadas ou não (Figura 17I, K). Essas diferenças morfológicas foram ratificadas pelas análises via MEV que identificaram células superficiais com diferentes formatos (Figura 17E, H, K).

Embora morfológicamente diferentes, em termos histológicos, os calos supracitados são semelhantes. Anatomicamente, os calos primários obtidos são, de modo geral, caracterizados pela presença de células vacuoladas, quase sempre desprovidas de componentes citoplasmáticos (Figura 17D, G, J), indicativo de baixa atividade metabólica. Os calos mucilaginosos em específico, são ricos em espaços intercelulares e conteúdo de natureza péctica (coloração arroxeada em corante Azul de Toluidina) (Figura 17G). Essas características anatômicas os enquadram como calos não

embriogênicos (RONCHI; GIORGETTI, 1995; SAMAJ *et al.*, 1999; NA *et al.*, 2007; KURCZYNSKA *et al.*, 2012; SILVEIRA *et al.*, 2013). Eventualmente, calos mais friáveis foram observados na base das flores pistiladas.

Aos 270 dias em meio de indução, calos com potencial embriogênico foram observados e sua porcentagem de formação avaliada (Figura 16). Esses calos foram caracterizados morfológicamente por formato nodular, cobertura mucilaginosa (hidratada, aquosa), centro compacto e coloração variando entre branco e bege (Figura 17L) e anatomicamente por células com características meristemáticas (Figura 17M).

Verificou-se que somente o explante flor pistilada seccionada longitudinalmente proporcionou a formação de calos com características embriogênicas (27,1% dos calos primários formaram estruturas com características embriogênicas) (Figura 16), provavelmente, devido à ação conjunta de dois fatores: o seccionamento e consequente exposição do explante ferido às condições estressantes do cultivo *in vitro* (como a alta concentração de Picloram) e a provável presença de minúsculas zonas em estado juvenil (meristemáticas) localizadas nas pétalas e sépalas (a ser confirmado em estudos anômicos posteriores). De acordo com Kriaa *et al.* (2012), essas zonas em flores maduras de *P. dactylifera* representam tecidos dormentes passíveis de serem ativados em condições específicas *in vitro*.

O seccionamento de explantes, segundo Fehér, Pasternak e Dudits (2003), pode ser um fator favorável ao aumento da capacidade morfogênica, uma vez que, possibilita o maior contato com componentes estressantes do meio (AHN *et al.*, 1996). Ademais, ressalta-se que o próprio estresse ocasionado pelo corte do explante, às vezes, pode ser o suficiente para iniciar uma rota morfogênica específica (SMITH; KRIKORIAN, 1989).

Salienta-se que o longo período para a obtenção de calos embriogênicos (9 meses) foi similar ao relatado por Kriaa *et al.* (2012) em *P. dactylifera*, que necessitaram, dependendo do genótipo, de até 12 meses para a obtenção de calos com potencial morfogênico. Esses resultados demonstram a necessidade de maior tempo de exposição de explantes mais diferenciados às altas concentrações de reguladores de crescimento, visando alcançar a rota morfogênica de interesse.

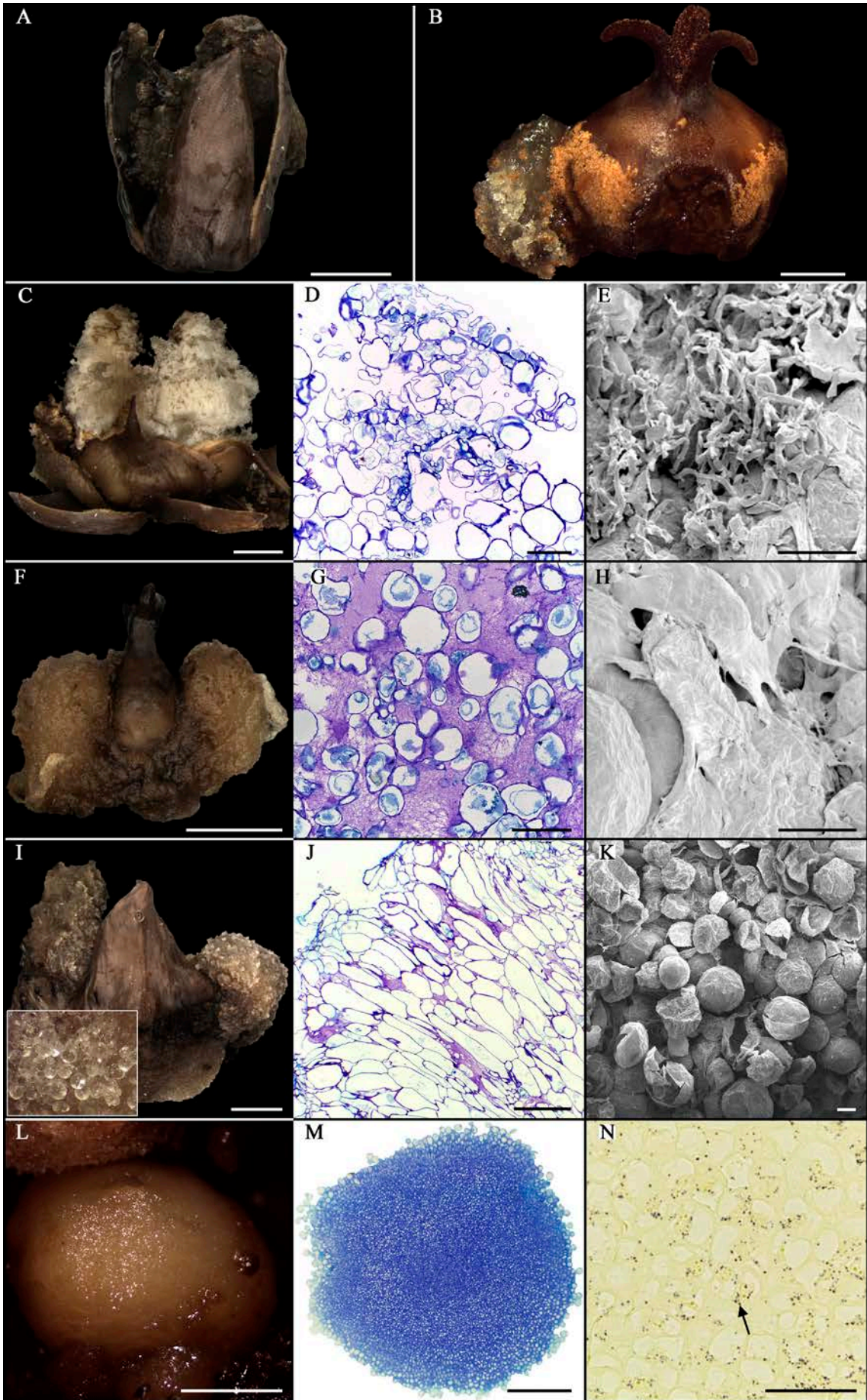


Figura 17. Estádios morfológicos da indução de calos a partir de flores maduras visando à embriogênese somática de gueroba (*Syagrus oleracea*). A: Explante oxidado aos 30 dias de cultivo. B: Formações calogênicas a partir de carpelos repartidos já aos 30 dias de cultivo. C: Calo esponjoso. D: Secção anatômica de calo esponjoso. E: Superfície do calo esponjoso analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). F: Calo mucilaginoso. G: Secção anatômica de calo mucilaginoso; notar mucilagem com coloração roxa. H: Superfície do calo mucilaginoso analisada por MEV. I: Calo compacto com superfície irregular. J: Secção anatômica de calo compacto. K: Superfície do calo compacto analisada por MEV. L: Calo embriogênico observado aos 270 dias de cultivo. M: Secção anatômica de calo embriogênico. N: Presença de grãos de amido em células meristemáticas do calo embriogênico. Barras = A, C, F, I: 5 mm; B, L: 2 mm; D, E, G: 200 μ M; J, M: 500 μ M; H, K: 100 μ M e N: 50 μ M.

3.3.2 Diferenciação de embriões somáticos

Após transferência dos explantes para meios contendo baixas concentrações de auxinas, notou-se, de modo geral, leve aumento da oxidação, além da formação, em meio com 1 μM de Picloram, de algumas poucas estruturas semelhantes a embriões somáticos no estágio globular, com formato nodular, consistência compacta e superfície lisa e brilhosa (Figura 18A, B). Aos 210 dias em meio de diferenciação (0,045 μM de Picloram), observou-se pouca evolução dos calos para formas embriogênicas, alguns, inclusive, adquirindo consistência totalmente mucilaginosa. Verificou-se também aquisição de coloração esbranquiçada de alguns possíveis embriões somáticos (Figura 18C) que, posteriormente, cessaram sua evolução.

Apesar da vantagem da alta disponibilidade, ausência de danos à planta mãe durante a coleta das espatas e possibilidade de clonagem de genótipos raros (KRIAA *et al.*, 2012), flores maduras exibem baixa capacidade embriogênica, com poucos relatos de sucesso em palmeiras. Esses relatos limitam-se, dentro do presente conhecimento, aos trabalhos de Kriaa *et al.* (2012) e Zayed *et al.* (2016) em *P. dactylifera*.

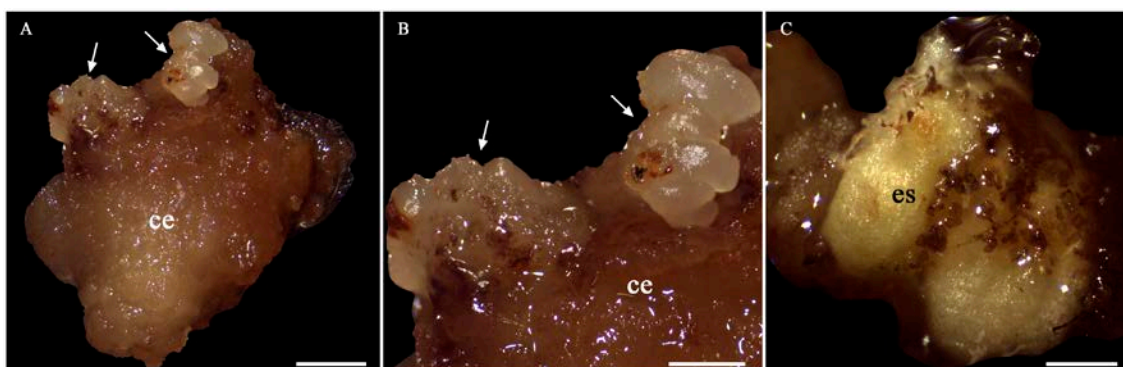


Figura 18. Embriões somáticos provenientes de flores maduras de gueroba (*Syagrus oleracea*), via embriogênese somática indireta. A, B: Embriões somáticos (setas) em estágio semelhante ao globular em meio com 1 μM de Picloram. C: Embriões somáticos com coloração esbranquiçada em meio com 0,045 μM de Picloram. Abreviação: (es) embrião somático. Barras = A: 2 mm; B: 1 mm e C: 0,5 mm.

4. CONCLUSÕES

- A embriogênese somática a partir de inflorescências imaturas de *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc. (gueroba), sob as condições de estudo, segue um modelo indireto.
- Auxina Picloram é eficiente para a indução de calos e formação de embriões somáticos de *S. oleracea* a partir de inflorescências imaturas.
- Tecidos imaturos (estádio I) provenientes de inflorescências de *S. oleracea* necessariamente não foram mais responsivos em termos de desdiferenciação e consequente formação de calos (independente da quantidade e qualidade dos calos) que tecidos menos imaturos (estádio II e III), porém, foram mais embriogênicos do que estes.
- Embriões somáticos de *S. oleracea* oriundos de inflorescências imaturas são morfoanatomicamente semelhantes aos embriões zigóticos da espécie.
- O processo de embriogênese somática a partir de inflorescências imaturas de *S. oleracea* é lento, assincrônico e com anormalidades (fusionamento). A limitada taxa de germinação dos embriões somáticos obtidos está relacionada ao alto grau de fusionamento, à germinação precoce e à maturação ineficiente.
- Flores femininas maduras de *S. oleracea*, longitudinalmente seccionadas, quando expostas à alta concentração de Picloram, exibem capacidade de formação de massas calogênicas com potencial embriogênico (com características meristemáticas), apesar do elevado grau de diferenciação dos seus tecidos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERLENC-BERTOSSI, F.; CHABRILLANGE, N.; DUVAL, Y.; TREGGAR, J. Contrasting globulin and cysteine proteinase gene expression patterns reveal fundamental developmental differences between zygotic and somatic embryos of oil palm. **Tree Physiology**, v. 28, p. 1157-1167, 2008.

AGUIAR, J. L. P.; ALMEIDA, S. P. **A Gueroba (*Syagrus oleracea* Becc.) nas Comunidades Rurais II: sistema de produção e avaliação econômica**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2000. 47p.

AHN, I. O.; BUI VAN LE, GENDY, C.; TRAN THANH VAN, K. Direct somatic embryogenesis through thin cell layer culture in *Panax ginseng*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 45, p. 237-243, 1996.

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.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1994. 445p.

BOTTI, C.; VASIL, I. K. Ontogeny of somatic embryos of *Pennisetum americanum*. II. In cultured immature inflorescences. **Canadian Journal of Botany**, v. 62, p. 1629-1635, 1984.

CABRAL, G. C.; CARNEIRO, V. T. C.; ROSSI, M. L.; SILVA, J. P.; MARTINELLI, A. P.; DUSI, D. M. A. Plant regeneration from embryogenic callus and cell suspensions of *Brachiaria brizantha*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 51, p. 369-377, 2015.

CANHOTO, J. M.; CRUZ, G. S. Histodifferentiation of somatic embryos in cotyledons of pineapple guava (*Feijoa sellowiana* Berg). **Protoplasma**, v. 191, p. 34-45, 1996.

CORREIA, S. M.; CANHOTO, J. M. Characterization of somatic embryo attached structures in *Feijoa sellowiana* Berg. (Myrtaceae). **Protoplasma**, v. 242, p. 95-107, 2010.

DELPORTE, F.; PRETOVA, A.; JARDIN, P.; WATILLON, B. Morpho-histology and genotype dependence of *in vitro* morphogenesis in mature embryo cultures. **Protoplasma**, v. 251, n. 6, p. 1455-1470, 2014.

DIAS, J. E. **Cadeia produtiva do óleo de gueroba (*Syagrus oleracea* Becc.): geração de renda para agricultores familiares e promoção da agrobiodiversidade, Buriti de Goiás (GO)**. 2012. 136p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2012.

DINIZ, J. A.; SÁ, L. F. **A cultura da guariroba**. Goiânia: EMATER-GO, 1995. 16 p. (Boletim Técnico, 3).

EL BAR, O. H. A.; EL DAWAYATI, M. M. Histological changes on regeneration *in vitro* culture of date palm (*Phoenix dactylifera*) leaf explants. **Australian Journal of Crop Science**, v. 8, n. 6, p. 848-855, 2014.

EMONS, A. M. C. Somatic embryogenesis: cell biological aspects. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 43, n. 1, p.1-14, 1994.

ETIENNE, H.; BERTRAND, B.; GEORGET, F.; LARTAUD, M.; MONTES, F.; DECHAMP, E.; VERDEIL, J.-L.; BARRY-ETIENNE, D. Development of coffee somatic and zygotic embryos to plants differs in the morphological, histochemical. **Tree Physiology**, v. 33, p. 640-653, 2013.

FEHÉR, A. Why somatic plant cells start to form embryos? In: MUJIB, S.; SAMAJ, J. (Eds.). **Somatic embryogenesis**. Heidelberg: Plant Cell Monographs, Springer, 2006. p. 85-101.

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

FKI, L.; MASMOUDI, R.; KRIAÂ, W.; MAHJOUR, A.; SGHAIER, B.; MZID, R.; MLIKI, A.; RIVAL, A.; DRIRA, N. Date Palm Micropropagation via Somatic Embryogenesis. In: JAIN, S. M.; AL-KHAYRI, J. M.; JOHNSON, D. V. (Eds.). **Date Palm Biotechnology**. Dordrecht: Springer, 2011. p. 47-68.

GABE, M. **Techniques histologiques**. Paris: Masson et Cie, 1968. 1113 p.

GADALLA, E. E.-D. G. Direct organogenesis from immature female inflorescence of date palm by gradual reduction of 2,4-D concentration. In: AL-KHAYRI, J. M.; JAIN, S. M.; JOHNSON, D. V. (Eds.). **Date Palm Biotechnology Protocols. Tissue Culture Applications**. New York: Humana Press, 2017. p. 26-35.

GARCIA, A. H.; VIEIRA, J. R.; COSTA, M. G. G. Contribuição ao conhecimento da biologia do *Pachymerus nucleorum* Fabr., 1792 (Bruchidae-Coleoptera) em *Syagrus oleracea* Mart. (Palmae). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 9, n.1, 1979.

GARCIA; ROSA, J. A. M.; COSTA, M. G. G. Contribuição ao conhecimento do ataque do *Pachymerus nucleorum* Fabr., 1792 (Bruchidae-Coleoptera) em *Syagrus oleracea* Mart. (Palmae). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 10, n.1, 1980.

GENOVESE-MARCOMINI, P. R.; MENDONÇA, M. S.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. Embryonic development of *Syagrus inajai* (Spruce) Becc. (Arecaceae, Arecoideae), an Amazonian. **Australian Journal of Botany**, v. 61, p. 611-621, 2013.

GOH, D. K. S.; BON, 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, p. 375-381, 2001.

GRAY, D.J.; COMPTON, M.E.; HARRELL, R.C.; CANTLIFFE, D.J. Somatic embryogenesis and the technology of synthetic seed. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry: Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed**. Berlin: Springer – Verlag, 1995. p. 126-151.

GUEDES, R S.; SILVA, T. L.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. N. Initial requirements for embryogenic calluses initiation in thin cell layers explants from immature female oil palm inflorescences. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 52, p. 10774-10780, 2011.

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

GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis in tissue cultures of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). In: AHUJA, M. R. (Ed.). **Woody Plant Biotechnology**. New York: Plenwn Press, 1991. p. 189-196.

GUEYE, B.; MORCILLO, F.; COLLIN, M.; GARGANI, D.; OVERVOORDE, P.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; VERDEIL, J. L. Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2,4-D treatment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 99, p. 35-45, 2009.

GUIDERDONI, E.; DEMARLY, Y. Histology of somatic embryogenesis in cultured leaf segments of sugarcane plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 14, p. 71-88, 1988.

HO, W.-J.; VASIL, I. K. Somatic Embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) I. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. **Protoplasma**, v. 118, p. 69-180, 1983.

JALIL, M.; CHEE, W. W.; OTHMAN, R. Y.; KHALID, N. Morphohistological examination on somatic embryogenesis of *Musa acuminata* cv. Mas (AA). **Scientia Horticulturae**, v. 117, p. 335-340, 2008.

JAYANTHI, M.; SUSANTHI, B.; NANDIGANTI, M. M.; MANDAL, P. K. *In vitro* somatic embryogenesis and plantlet regeneration from immature male inflorescence of adult dura and tenera palms of *Elaeis guineensis* (Jacq.). **SpringerPlus**, v. 4, n. 256, p. 1-7, 2015.

JAYARAJ, K. L.; BHAVYASHREE, U.; FAYAS, T. P.; SAJINI, K. K.; RAJESH, M.K.; KARUN, A. Histological studies of cellular differentiation during somatic embryogenesis of coconut plumule-derived calli. **Journal of Plantation Crops**, v. 43, n. 3, p. 196-203, 2015.

JOHANSEN, D. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill, 523 p. 1940.

JOY IV, R. W.; YEUNG, E. C.; KONG, L.; THORPE, T. A. Development of white spruce somatic embryos: I. Storage product deposition. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 27, p. 32-41, 1991.

KÄRKÖNEN, A. Anatomical study of zygotic and somatic embryos of *Tilia cordata*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 61, p. 205-214, 2000.

KARNOVSKY, M. J. A. formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137-138, 1965.

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, p. 1623-1628, 2004.

KRIAA, W.; SGHAIER, B.; MASMOUDI, F.; BENJEMAA, R.; DRIRA, N. The date palm (*Phoenix dactylifera* L.) micropropagation using completely mature female flowers. **Comptes Rendus Biologies**, v. 335, p. 194-204, 2012.

KURCZYNSKA, E. U.; POTOCKA, I.; DOBROWOLSKA, I.; KULINSKA-LUKASZEK, K.; SALA, K.; WROBEL, J. Cellular markers for somatic embryogenesis. In: SATO, K. I. (Ed.). **Embryogenesis**. InTech, 2012, p. 307-332.

LAUKKANEN, H.; HÄGGMAN, H.; KONTUNEN-SOPPELA; HOHTOLA, A. Tissue browning of in vitro cultures of Scots pine: Role of peroxidase and polyphenol oxidase. **Physiologia Plantarum**, v. 106, p. 337-343, 1999.

LEDO, A. S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K.; de 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, p. 601-603, 2002.

LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. An improved protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from mature zygotic embryos. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 118, p. 485-496, 2014.

MAGALHÃES, H. M.; LOPES, P. S. N.; RIBEIRO, L. M.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; OLIVEIRA, D. M. T. Structure of the zygotic embryos and seedlings of *Butia capitata* (Arecaceae). **Trees**, v. 27, p. 273-283, 2013.

MAXIMOVA, S. N.; ALEMANNI, L.; YOUNG, A.; FERRIERE, N.; TRAORE, A.; GUILTINAN, M. J. Efficiency, genotypic variability, and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. **In Vitro Cell Developmental Biolology – Plant**, v. 38, p. 252-259, 2002.

MELO, B. de. **Cultivo de embrião in vitro da Guarirubeira [*Syagrus oleracea* (Mart.)]**. 2000. 117p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

MICHAUX-FERRIÈRE, N.; GROUT, H.; CARRON, M. P. Origin and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae). **American Journal of Botany**, v. 79, n. 2, p. 174-180, 1992.

MOURA, E. F.; VENTRELLA, M. C.; MOTOIKE, S. Y. Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). **Scientia Agricola**, v. 67, p. 399-407, 2010.

MOUSAVIZADEH, S. J.; MASHAYEKHI, K.; AKBARPOUR, V.; KALATI, H.; GHASEMI, Y. Effect of IAA and 2,4-D on somatic embryogenesis and pigments synthesis of carrot root secondary phloem. **Australian Journal of Agricultural Engineering**, v. 1, n. 4, p. 126-131, 2010.

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

NA, H.; KIM, K. W.; KWACK, Y.; KIM, S. K.; CHUN, C. Comparative anatomy of embryogenic and non-embryogenic calli from *Pimpinella brachycarpa*. **Journal of Plant Biology**, v. 50, n. 3, p. 344-350, 2007.

O'BRIEN T. P.; MCCYLLY, M. E. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Melbourne: Termarcarphi PTY. LTD, 1981.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCYLLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, p. 368-373, 1964.

OLIVEIRA, N. C. C.; LOPES, P. S. N.; RIBEIRO, L. M.; MERCANDANTE-SIMÕES, M. O.; OLIVEIRA, L. A. A.; SILVÉRIO, F. O. Seed structure, germination, and reserve mobilization in *Butia capitata* (Arecaceae). **Trees**, v. 27, p. 1633-1645, 2013.

PÁDUA, M. S.; SANTOS, R. S.; LABORY, C. R. G.; STEIN, V. C.; MENDONÇA, E. G.; ALVES, E.; PAIVA, L. V. Histodifferentiation of oil palm somatic embryo development at low auxin concentration. **Protoplasma**, p. 1-11, 2017.

PERERA, P. I. P.; YAKANDAWALA, D. M. D.; HOCHER, V.; VERDEIL, J.-L.; WEERAKOON, L. K. Effect of growth regulators on microspore embryogenesis in coconut anthers. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 96, p. 171-180, 2009a.

PERERA, P. I. P.; VIDHANAARACHCHI, V. R. M.; GUNATHILAKE, T. R.; YAKANDAWALA, D. M. D. HOCHER, V.; VERDEIL, J. L.; WEERAKOON, L. K. Effect of plant growth regulators on ovary culture of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 99, p. 73-81, 2009b.

PINTO, G.; SILVA, S.; NEVES, L.; ARAUÚJO, C.; SANTOS, C. Histocytological changes and reserve accumulation during somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus*. **Trees**, v. 24, p. 763-769, 2010.

PLATA, E.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, A. M. An anatomical study of secondary embryogenesis in *Camellia reticulata*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 27, p. 183-189, 1991.

QUIROZ-FIGUEROA, F. R.; FUENTES-CERDA, C. F. J.; ROJAS-HERRERA, R.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Histological studies on the developmental stages and

differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 1141-1149, 2002.

R CORE TEAM (2015). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em: 28 jan 2015.

RAJU, C. S.; ASLAM, A; KATHIRAVAN, K.; PALANI, P.; SHAJAHAN, A. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf sheath explants of mango ginger (*Curcum amada* Roxb.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 50, n. 6, p. 752-759, 2014.

RAJU, C. S.; ASLAM, A; SHAJAHAN, A. High-efficiency direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf base explants of turmeric (*Curcuma longa* L.). **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v. 122, n. 1, p. 79-87, 2015.

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

RIBEIRO, L. M.; OLIVEIRA, D. M. T.; GARCIA, Q. S. Structural evaluations of zygotic embryos and seedlings of the macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae) during *in vitro* germination. **Trees**, v. 26, p. 851-863, 2012.

RONCHI, V. N.; GIORGEITI, L. The Cell's Commitment to Somatic Embryogenesis. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry: Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed**. Berlin: Springer – Verlag, 1995. p. 3-19.

SAÉNZ, L.; AZPEITIA, A.; CHUC-ARMENDARIZ, B.; CHAND, 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.

SAMAJ, J.; BALUSKA, F.; BOBÁK, M.; VOLKMANN, D. Extracellular matrix surface network of embryogenic units of friable maize callus contains arabinogalactan-proteins recognized by monoclonal antibody JIM4. **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 369-374, 1999.

SANDOVAL-CANCINO, G.; SAÉNZ, L.; CHAN, J. L.; OROPEZA, C. Improved formation of embryogenic callus from coconut immature inflorescence explants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 52, n. 4, p. 367-378, 2016.

SANÉ, D.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; GASSAMA-DIA, Y. K.; SAGNA, M.; TROUSLOT, M. F.; DUVAL, Y.; BORGEL, A. Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). **Annals of Botany**, v. 98, p. 301-308, 2006.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; DA GUEDES, R. S.; FERMINO JR., P. C. P.; SILVA, T. L.; COSTA, F. H. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 46, p. 378-385, 2010.

SCHUMANN, G.; RYSCHKA, U.; SCHULZE, J.; KLOCKEL, E. Anatomy of Somatic Embryogenesis. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry: Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed**. Berlin: Springer – Verlag, 1995. p. 71-86.

SCHWENDIMAN, J.; PANNETIER, C.; N. MICHAUX-FERRIERE. Histology of Somatic Embryogenesis from Leaf Explants of the Oil Palm *Elaeis guineensis*. **Annals of Botany**, v. 62, n. 1, p.43-52, 1988.

SGHAIER, B.; BAHLOUL, M.; GARGOURI BOUZID, R.; DRIRA, N. Development of zygotic and somatic embryos of *Phoenix dactylifera* L. cv. Deglet Nour: comparative study. **Scientia Horticulturae**, v. 116, p. 169-175, 2008.

SHARMA, S. K.; MILLAM, S. Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L.: a histological examination of key developmental stages. **Plant Cell Report**, v. 23, p. 115-119, 2004.

SHIMOKOMAKI, M.; ABDALA, C.; FRANCA, J. F.; DRAETTA, I. S.; FIGUEIREDO, I. B.; ANGELUCCI, E. Estudo comparativo entre os palmitos de sabor doce (palmito-juçara - *Euterpe edulis* Mart. e açai - *Euterpe oleracea* Mart.) e de Sabor Amargo (guariroba - *Syagrus oleracea* Becc.). 1 - Composição química, péptides e aminoácidos livres. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 6, p. 69-79, 1975.

SIDKY, R. A.; ELDAWYATI, M. M. Proliferation of female inflorescences explants of date palm. **Annals of Agricultural Science**, v. 57, n. 2, p. 161-165, 2012.

SILVA, R. S.; RIBEIRO, L. M.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; NUNES, Y. R. F.; LOPES, P. S. N. Seed structure and germination in buriti (*Mauritia flexuosa*) - the swamp palm. **Flora**, v. 209, n. 11, p. 674-685, 2014.

SILVEIRA, V.; VITA, A. M.; MACEDO, A. F.; DIAS, M. F. R.; FLOH, E. I. S.; SANTA-CATARINA, C. Morphological and polyamine content changes in embryogenic and non-embryogenic callus of sugarcane. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 114, n. 3, p. 351-64, 2013.

SMITH, D. L.; KRIKORIAN, A. D. Release of somatic embryogenic potential from excised zygotic embryos of carrot and maintenance of proembryonic cultures in hormone-free medium. **American Journal of Botany**, v. 76, p. 1832-1843, 1989.

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, p. 15-22, 2007.

STEINMACHER, D. A.; GUERRA, M. P.; SAARE-SURMINSKI, K.; LIEBEREI, R. A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, v. 108, n. 8, p. 1463-1475, 2011.

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

TISSERAT, B. Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in vitro. **Journal of Experimental Botany**, v. 30, n. 119, p. 1275-1283, 1979.

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

VIDAL, B. C. Dichroism in collagen bundles stained with xyloidine-Ponceau 2R. **Annales d'Histochimie**, v. 15, p. 289-296, 1970.

VINODHANA, N. K.; GANESAN, N. M. Studies on embryogenic competence and regeneration potential with relation to anthocyanin biosynthesis in cotton (*G. hirsutum*). **Plant Gene and Trait**, v. 4, n. 10, p. 53-59, 2013.

VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHOKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 233-249. 2002.

WILLIAMS, E. S.; MAHESWARAN, B. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, v. 57, p. 443-462, 1986.

YEUNG, E. C. Structural and development patterns in somatic embryogenesis. In: THORPE, T. A. (Eds.). **In Vitro Embryogenesis in Plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 205-247. 1995.

ZAYED, E. M. M.; ABD ELBAR, O. H. Morphogenesis of immature female inflorescences of date palm *in vitro*. **Annals of Agricultural Science**, v. 60, n. 1, p. 113-120, 2015.

ZAYED, E. M. M.; ZEIN EL DIN, A. F. M.; MANAF, H. H.; ABDELBAR, O. H. Floral reversion of mature inflorescence of date palm *in vitro*. **Annals of Agricultural Science**, p. 1-9, 2016.

ZHOU, T.; YANG, X.; GUO, K.; DENG, J.; XU, J.; GAO, W.; LINDSEY, K.; ZHANG, X. ROS homeostasis regulates somatic embryogenesis via the regulation of auxin signaling in cotton. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 15, p. 2108-2124, 2016.

CONCLUSÕES GERAIS

- Auxina 2,4-D porta-se como indutora eficaz da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos maduros de *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc. (gueroba), ao passo que Picloram mostra-se eficiente para a indução de calos a partir de explantes foliares e inflorescências imaturas da espécie em questão.
- Oxidação dos explantes necessariamente não é um fator limitante ao processo de embriogênese somática de *S. oleracea*.
- Lentidão, assincronia e anormalidades são características típicas das etapas finais (maturação e germinação de plantas) do processo de embriogênese somática a partir de fontes diversas de explantes da palmeira em estudo.
- Tecidos vasculares de diferentes fontes de explantes estão envolvidos nos eventos iniciais da embriogênese somática de *S. oleracea*; embriões somáticos de origem unicelular e multicelular podem ser obtidos em um mesmo sistema embriogênico e calos partilham características morfoanatômicas comuns independente do agente indutor e do explante utilizado.
- Amido destaca-se como fonte de energia para a formação de áreas embriogênicas em diferentes explantes de gueroba, embora não se comporte como um marcador sistemático da competência embriogênica, e compostos fenólicos estão envolvidos com os processos subjacentes à embriogênese somática de gueroba na maioria dos explantes testados.
- *S. oleracea* provê um modelo útil para a investigação dos conceitos e eventos iniciais da embriogênese somática em palmeiras, sobretudo, devido a rápida e alta responsividade dos diferentes explantes testados, com destaque para o uso de embriões zigóticos na elucidação dos aspectos relacionados à embriogênese somática direta.
- Microscopias anatômica e eletrônica combinadas com análises histoquímicas são ferramentas extremamente proficientes para a melhor compreensão da morfogênese *in vitro*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sugere-se, com base nos resultados obtidos a partir dos diferentes explantes testados, a redução do tempo de exposição à auxina indutora, de modo a garantir além da qualidade dos embriões somáticos, a redução de custos e de tempo. Dada a responsividade observada já aos sete dias em meio de indução, especificamente dos explantes embriões zigóticos, recomenda-se testar pulsos de auxina nesses explantes.

Investigações ontogênicas futuras são necessárias para confirmação da participação do *pool* de células procambiais (*stem cells*), localizado nas vizinhanças dos tecidos vasculares, na formação direta de calos em explantes foliares de gueroaba (sem a etapa prévia de dediferenciação celular).

Em função da maior responsividade das nervuras principais dos explantes foliares de *S. oleracea* na produção de calos, propõe-se examinar o efeito do isolamento dessas regiões foliares em estudos subsequentes.

Recomenda-se a otimização das etapas de maturação e germinação de embriões somáticos de *S. oleracea*.

ANEXO

ANEXO 1

Mapa dos pontos de coleta do material vegetal a ser utilizado (frutos, palmitos e inflorescências) de guerobera (*Syagrus oleracea*) em todos os experimentos desse estudo.

