

**ESTABELECIMENTO DE CULTURAS EM SUSPENSÃO DE *Euterpe precatoria*
MART. (ARECACEAE)**

ALEXANDRO DIAS MARTINS VASCONCELOS

**DOUTORADO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS DEPARTAMENTO DE
ENGENHARIA FLORESTAL UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**FACULDADE DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL

ESTABELECIMENTO DE CULTURAS EM SUSPENSÃO DE
Euterpe precatoria MART. (ARECACEAE)

ALEXANDRO DIAS MARTINS VASCONCELOS

ORIENTADOR: Dr. JONNY EVERSON SCHERWINSKI-PEREIRA

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS

BRASÍLIA-DF,
MAIO DE 2024

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL**

**ESTABELECIMENTO DE CULTURAS EM SUSPENSÃO DE
Euterpe precatoria MART. (ARECACEAE)**

ALEXANDRO DIAS MARTINS VASCONCELOS

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR.

APROVADO POR:

Dr. JONNY EVERSON SCHERWINSKI-PEREIRA

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (PBI/Cenargen)
(Orientador)

Dr. ANDERSON MARCOS DE SOUZA

Universidade de Brasília (UnB/Dpt.º de Engenharia Florestal)
(1º examinador)

Dr.ª INAÊ MARIÊ DE ARAÚJO SILVA-CARDOSO

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (PBI/Cenargen)
(2º examinador)

Dr. FREDERICO HENRIQUE DA SILVA

Universidade Federal do Acre (UFAC)
(3º examinador)

Dr. PAULO CÉSAR POETA FIRMINO JÚNIOR

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)
(Suplente)

BRASÍLIA/DF, 09 DE MAIO DE 2024.

FICHA CATALOGRÁFICA

Dias Martins Vasconcelos, Alexandro
DV331e Estabelecimento de Culturas em Suspensão de *Euterpe precatoria*
(Arecaceae) / Alexandro Dias Martins Vasconcelos; orientador JONNY EVERSON
SCHERWINSKI-PEREIRA. -- Brasília, 2024.

160 p.

Tese (Doutorado em Ciências Florestais) -- Universidade de Brasília, 2024.

1. Embriogênese Somática. 2. Cultivo in vitro de plantas. 3. Meio de Suspensão Celular.
4. Calos embriogênicos. 5. Caracterização bioquímica. I. SCHERWINSKI-PEREIRA, JONNY
EVERSON, orient. II. Título.

REFERÊNCIA

VASCONCELOS, A.D.M. (2024). Estabelecimento de Culturas em Suspensão de *Euterpe precatoria* Mart. (Arecaceae). Tese de Doutorado, Departamento de Engenharia Florestal, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 160 p.

CESSÃO DE DIREITOS

Alexandro Dias Martins VASCONCELOS
Estabelecimento de Culturas em Suspensão de *Euterpe precatoria* Mart. (Arecaceae)
Doutor/2024

É concedida à Universidade de Brasília a permissão para reproduzir a Tese de Doutorado e para emprestar ou vender somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva outros direitos de publicação e nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Alexandro Dias Martins VASCONCELOS
Brasília/DF -Brasil

Dedico esse trabalho a Deus, sobre todas as coisas. Dedico à minha família, minha esposa Amanda, aos meus filhos Arthur, João Luccas, Andressa e Lunna, aos meus pais Alfredo e Almira. Dedico a minha única avó viva, Ahhh Dona Amália, minha mainha de coração. Dedico ao meu orientador Jonny, por não soltar a minha mão e acreditar em mim.

AMO TODOS VOCÊS!!!!

Somos seres em construção...

Durante a nossa vida, causamos transtornos na vida de muitas pessoas, porqu
imperfeitos.

Nas esquinas da vida, pronunciamos palavras inadequadas, falamos sem nece
incomodamos.

Nas relações mais próximas, agredimos sem intenção ou intencionalmente. Mas
agredimos.

Não respeitamos o tempo do outro, a história do outro. Parece que o mundo gira em torno
dos nossos desejos, e o outro é apenas um detalhe.

E, assim, vamos causando transtornos. Esses tantos transtornos mostram que não estamos
prontos, mas em construção.

Tijolo a tijolo, o templo da nossa história vai ganhando forma. O outro também está em
construção e também causa transtornos.

E, às vezes, um tijolo cai e nos machuca. Outras vezes, é a cal ou o cimento que suja nosso
rosto. E quando não é um, é outro. E o tempo todo nós temos que nos limpar e cuidar das
feridas, assim como os outros que convivem conosco também têm de fazer.

Os erros dos outros, os meus erros. Os meus erros, os erros dos outros.

Esta é uma conclusão essencial: todas as pessoas erram. A partir dessa conclusão,
chegamos a uma necessidade humana e cristã: O PERDÃO.

Perdoar é cuidar das feridas e sujeiras. É compreender que os transtornos são muitas vezes
involuntários. Que os erros dos outros são semelhantes aos meus erros e que, como
caminhantes de uma jornada, é preciso olhar adiante.

Se nos preocupamos com o que passou, com a poeira, com o tijolo caído, o horizonte
deixará de ser contemplado. E será um desperdício.

O convite que faço é que você experimente a beleza do perdão.
É um banho na alma! Deixa leve!

Se eu errei,
Se eu o magoei,
Se eu o julguei mal....
Desculpe-me por todos esses transtornos...

Estou em construção!

PAPA FRANCISCO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, pela vida, pela minha família, pelas graças concedidas, pelas bênçãos e por sempre iluminar o meu caminho. Obrigado por tudo que destes, pois o pouco com Deus é muito, e o muito sem Deus não é nada.

Ao nosso Senhor Jesus Cristo, Obrigado por me manter firme nas horas mais difíceis da minha vida. Toda honra e toda glória da minha vida sejam dadas a Ti Senhor.

Aos meus pais, Almira e Alfredo, por todo amor, carinho, por todo esforço que vocês fizeram para me educar e por acreditarem em mim. Eu amo vocês e obrigado por tudo, meus guerreiros, minha felicidade, meus amores

À minha esposa e companheira, Amanda, que sempre esteve ao meu lado, ajudando e me apoiando em todos os momentos da minha vida, obrigado, meu amor, te amo meu coração!

À minha sogra, Janoelma, um anjo de pessoa que sempre esteve pronta para me ajudar e ajudar a minha família, não importasse o problema, obrigado por todo amor, todo carinho e toda confiança. À Dona Maria José, por todo apoio, por todo carinho, atenção, pelas ajudas, pelos ensinamentos, por sempre nos acolher quando precisamos, obrigado por tudo!

Ao meu orientador, Professor Jonny, por toda paciência, pela orientação e pelos ensinamentos, pela amizade, pelo carinho, pela confiança a mim dada e por ter concedido a minha permanência junto a minha família, sou muito grato professor, MUITO OBRIGADO!

Aos meus amigos do PPGCF: Jorge, Guido, Peter e Jéssica. Aos meus amigos do LCTII Joane, Rennan, Elias, Thauan, André, Inaê, Professor Fred, a Marcia, Mariana, Gi e Aninha, em especial você Aninha minha querida amiga.

Ao Professor Anderson Marcos de Souza que me acolheu em Brasília e sempre esteve a postos para ajudar, a segurar a minha mão. Obrigado professor!! Aos professores da Pós Graduação Éder, Eraldo, José Roberto, Rosana, Fernando, Ildeu e Álvaro, agradeço pelos ensinamentos, pelo carinho e pela compreensão, muito obrigado!! Em especial, ao professor Éder Miguel pelo apoio. Muito obrigado professor!!

Ao meu médico, Manoel Júnior, que me ajudou e que me fortaleceu, foi muito importante para mim. Obrigadoo meu querido amigo!!!

A minha família que reside em Brasília, minhas tias irmãs da minha avó, meus tios, meus primos e primas, meus sobrinhos e todo familiar que de alguma forma me ajudou. Ao professor Dr. Robson José de Oliveira (*in memoriam*).

À Universidade Federal do Piauí, à Universidade Brasília, à Empraba e a Capes pelo apoio financeiro. A todos vocês, muito obrigado!!!

SUMÁRIO

ESTABELECIMENTO DE CULTURAS EM SUSPENSÃO DE <i>Euterpe precatoria</i> MART. (ARECACEAE)	1
CESSÃO DE DIREITOS	4
RESUMO GERAL	12
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
CAPÍTULO I	19
REVISÃO DE LITERATURA	19
<i>Euterpe precatoria</i> Mart., EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E CULTIVOS EM SUSPENSÃO	19
5 REVISÃO DE LITERATURA	20
5.1 Caracterização botânica, fenologia e biologia reprodutiva do açaí-solteiro	20
5.2 Propagação vegetativa.....	24
5.3 Embriogênese somática.....	27
5.5 Cultivos em suspensão, modelagem e parâmetros cinéticos	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
CAPÍTULO II	49
ESTABELECIMENTO, MULTIPLICAÇÃO E ANÁLISE BIOQUÍMICA DE LINHAGENS EMBRIOGÊNICAS DE <i>Euterpe precatoria</i> Mart. SOB CULTIVO EM SUSPENSÃO	49
RESUMO	50
ABSTRACT	51
1 INTRODUÇÃO	52
MATERIAL E MÉTODOS	54
Local de desenvolvimento da pesquisa	54
Material vegetal, indução e multiplicação dos calos embriogênicos em meio semissólido.....	54
a) Indução e multiplicação de calos oriundos de tecidos foliares	54
b) Indução e multiplicação de calos oriundos de inflorescências	54

c) Indução e multiplicação de calos oriundos de embriões zigóticos	55
Pesagem dos materiais embriogênicos em meio semissólido	55
Estabelecimento de linhagens embriogênicas e multiplicação de agregados em suspensão ...	56
Caracterização das linhagens.....	57
Delineamento e análise estatística da pesagem dos calos cultivados em meio semissólido x meio líquido.....	58
Modelagem de Gompertz	59
Parâmetros cinéticos.....	59
Análise dos Componentes Principais (PCA).....	59
Caracterização bioquímica	59
Açúcares Solúveis Totais (AST)	60
Proteínas totais (PST).....	60
RESULTADOS	62
Estabelecimento inicial de calos em meio líquido e multiplicação de agregados e células em suspensão.....	62
Cinética de crescimento de calos e agregados celulares e aplicação de modelo matemático de Gompertz.....	68
Análise dos Componentes Principais (PCA).....	72
Caracterização bioquímica - teores Açúcares Solúveis Totais (AST) e Proteínas Solúveis Totais (PST) de <i>E. precatória</i>	76
DISCUSSÃO	79
Estabelecimento inicial de calos em meio líquido e multiplicação de células e agregados em suspensão	79
Gompertz e cinética do crescimento	81
Correlações do crescimento entre as linhagens avaliadas por análise de componentes principais	83
Análises bioquímicas.....	84
CONCLUSÃO.....	89
REFERÊNCIAS.....	90
CAPÍTULO III.....	98

OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE CULTIVO EM SUSPENSÃO DE <i>Euterpe precatoria</i> Mart.	98
RESUMO	99
ABSTRACT	100
INTRODUÇÃO	101
MATERIAL E MÉTODO	103
Local de condução da pesquisa	103
Caracterização das linhagens e condições de cultivo	103
Experimento 1: Efeito do meio de cultura e da combinação de diferentes auxinas na multiplicação de agregados celulares e células em suspensão de linhagens calogênicas oriundas de folhas jovens de <i>Euterpe precatoria</i> Mart.....	105
Experimento 2: Efeito do meio de cultura e da combinação de diferentes auxinas na multiplicação de agregados celulares e células em suspensão de linhagens calogênicas oriundas de inflorescências imaturas <i>Euterpe precatoria</i> Mart.	106
Condições de cultivo	107
Avaliação do crescimento	108
Taxa de crescimento.....	109
Modelagem de Gompertz	109
Parâmetros cinéticos.....	109
Classes de volume por Sturges.....	109
Análise anatômica	110
Análise estatística dos dados	110
RESULTADOS	110
Experimento 1: Efeito do meio de cultura e da combinação de diferentes auxinas na multiplicação de agregados celulares e células em suspensão de linhagens calogênicas oriundas de folhas jovens de <i>Euterpe precatoria</i> Mart.....	110
Cinética de crescimento e aplicação de modelo matemático de Gompertz	115
Caracterização do tamanho dos calos e agregados celulares em suspensão	119
Características anatômicas dos calos oriundos de folha imaturas cultivados em meio líquido	122

Características do crescimento e morfologia dos calos e agregados celulares oriundos de folhas imaturas de <i>Euterpe precatoria</i>	127
Experimento 2: Efeito do meio de cultura e da combinação de diferentes auxinas na multiplicação de agregados celulares e células em suspensão de linhagens oriundas de material somático de inflorescências imaturas <i>Euterpe precatoria</i> Mart.....	131
Estabelecimento e multiplicação de agregados celulares e células em suspensão de tecidos somáticos de inflorescência imaturas de <i>E. precatoria</i> Mart.	132
Cinética de crescimento e aplicação de modelo matemático de Gompertz de agregados celulares e células em suspensão de tecidos somáticos de inflorescência imaturas de <i>E. precatoria</i> Mart	137
Caracterização do tamanho dos calos e agregados celulares em suspensão	140
Características anatômicas dos calos em meio líquido	141
Características do crescimento e morfologia dos calos e agregados celulares de materiais somáticos de inflorescências imaturas de <i>Euterpe precatoria</i>	145
DISCUSSÃO	149
REFERÊNCIAS	156

RESUMO GERAL

A palmeira *Euterpe precatoria* Mart. (açai-solteiro), conhecida mundialmente possui grande importância econômica no Brasil. Originário da Floresta Amazônica, é consumido como alimento básico por muitas comunidades na região. O açai é uma palmeira que vai além dos seus usos tradicionais devido sua relevância nutricional e seus benefícios para a saúde humana. O açai é uma palmeira tão importante para nutrição humana, que recebeu outro título, o de “super fruto”, tornando-a ainda mais importante economicamente. O fruto ganhou reconhecimento internacionalmente devido às suas propriedades energéticas e sua riqueza em minerais, ácidos graxos, antocianinas e antioxidantes. Essas características têm impulsionado o consumo da polpa de açai nos últimos anos. Assim, objetivou-se, nesta pesquisa, estabelecer linhagens embriogênicas em meio de consistência líquida (suspensão celular) e avaliar a cinética do crescimento de estruturas embriogênicas de *E. precatoria* Mart, oriundas de embriões zigóticos, tecidos foliares jovens e inflorescências imaturas. É importante destacar que, até agora, não há relatos na literatura sobre o uso dessa técnica para a reprodução dessa espécie. No primeiro artigo, avaliou-se o crescimento oito linhagens (L1-L6 e L8), oriundas de tecidos foliares, embriões zigóticos e inflorescência imaturas, em meio líquido (500 mg calos embriogênicos) de MS suplementados com 5 μ M Picloram (5 linhagens) e, para fins comparação em meio semissólido (1,050 g de calo embriogênico) de MS suplementado com 13,57 μ M Picloram (3 linhagens). A curva de crescimento foi obtida a partir da pesagem dos calos entre 60 até 180 dias de cultivo. O modelo Gompertz foi aplicado e a cinética de crescimento foi avaliada. Aos 100 dias, verificaram-se o teor de açúcares e proteínas solúveis totais. O cultivo de linhagens de *E. precatoria* em meio de consistência líquida foi realizado com sucesso e o estabelecimento foi obtido. As linhagens apresentaram diferenças estatísticas na curva de crescimento. Foi verificada a ausência da fase lag λ (dia). O modelo de Gompertz pode ser adequado, uma vez que descreve mais de 90% da cinética de crescimento das linhagens. A análise multivariada revela elevado incremento de massa em culturas líquidas, representadas pelas linhagens L6 e L2. Diferenças estatísticas foram constatadas nos teores de Açúcares Solúveis Totais (AST), e os maiores níveis foram observados nas linhagens cultivadas em meio líquido. O teor de proteínas encontrado foi muito baixo, apresentando diferenças estatísticas entre as linhagens. A multiplicação apresenta comportamento ao longo dos subcultivos, tanto entre linhagens quanto entre períodos de cultivo. No segundo artigo, avaliou-se a otimização do protocolo, utilizando materiais somáticos de origem foliar. Seis linhagens (LT1- LT6) foram avaliadas em seis meios diferentes, sendo os meios respectivamente PIC; PIC+AIB; PIC+ANA; 2,4-D; 2,4-D+AIB e 2,4-D+ANA. Avaliaram-se, ao longo de 180 dias de cultivo, a oxidação, o volume e contaminação. A análise dos componentes principais foi estimada. O modelo Gompertz foi aplicado e a cinética do crescimento foi determinada. O protocolo foi otimizado com sucesso. Os resultados obtidos foram acima do esperado, tendo uma taxa de crescimento médios acima dos 1.400%. Aos 100 dias, verificou-se que os calos apresentaram competência embriogênica. A dinâmica de crescimento foi variável entre as linhagens. As linhagens apresentaram diferenças estatísticas na curva de crescimento. A fase lag λ (dia) foi determinada neste estudo. O modelo de Gompertz pode ser adequado, com curvas sigmóides uma vez que descreve mais de 70% da cinética de crescimento das linhagens. A análise multivariada revela que há similaridade entre as linhagens. O protocolo de cultivos de açai-solteiro em meio de consistência líquida foi otimizado. A produção de calos embriogênicos friáveis foi melhorada. As linhagens apresentaram diferença significativa em razão do efeito das composições dos meios de cultivo ao longo do tempo. A oxidação não impede a produção de calos embriogênicos friáveis. Os calos podem ser multiplicados tanto usando auxina Picloram quanto 2-4-D. As análises anatômicas revelam que os calos têm competência embriogênica.

Palavras chaves: Embriogênese somática; meio líquido; caracterização bioquímica; regulador de crescimento; auxina.

ABSTRACT

The palm tree *Euterpe precatoria* Mart. (açai), known world wide, has great economic importance in Brazil. Originally from the Amazon Rainforest, it is consumed as a staple food by many communities in the region. Açai is a palm tree so important for human nutrition that it received another title “super fruit”, making it even more economically important. The fruit has gained international recognition due to its energetic properties and its richness in minerals, fatty acids, anthocyanins and antioxidants. These characteristics have driven the consumption of açai pulp in recent years. Thus, the objective of this research was to establish embryogenic lines in a liquid consistency medium (cell suspension) and evaluate the growth kinetics of embryogenic structures of *E. precatoria* originating from zygotic embryos, young leaf tissues and immature inflorescences. It is important to highlight that, until now, there are no reports in the literature, on the use of this technique to reproduce this species. In the first article, the growth of eight lines (L1 – L8) was evaluated, originating from leaf tissues, zygotic embryos and immature inflorescences, in liquid medium (500 mg embryogenic callus) of MS supplemented with 5 μ M Picloram (five lines) and, for comparison purposes in semi-solid MS medium (1.050 g embryogenic callus) supplemented with 13.57 μ M Picloram (three lines). The growth curve was obtained from weighing the calli between 60 and 180 days of cultivation. The Gompertz model was applied and growth kinetics were evaluated. At 100 days, the total sugar and soluble protein content was checked. The cultivation of *E. precatoria* strains in liquid consistency medium was successfully carried out and establishment was achieved. The strains showed statistical differences in the growth curve. The absence of lag phase A (day) was verified. The Gompertz model may be appropriate, as it describes more than 90% of the lineages growth kinetics. Multivariate analysis reveals a high increase in mass liquid cultures, represented by lineages L6 and L2. Statistical differences were found in the levels of Total Soluble Sugars (AST), and the highest levels were observed in strains grown in liquid medium. The protein content found was very low, showing statistical differences between the strains. Multiplication presents behavior throughout subcultures, both between lineages and between cultivation periods. In the second article, the optimization of the protocol was evaluated, using somatic materials of leaf origin. Six strains (L1 – L6), were evaluated in six different media, respectively PIC; PIC+AIB; PIC+ANA; 2,4-D; 2,4-D+AIB and 2,4-D+ANA. Over 180 days of cultivation, oxidation, volume and contamination were evaluated. Principal component analysis was estimated. The Gompertz model was applied and growth kinetics were determined. The protocol was successfully optimized. The results obtained were above expectations, with an average growth rate above 1400%. At 100 days, it was found that the calli showed embryogenic competence. The growth dynamics, although variable between strains, were satisfactory. The strains showed statistical differences in the appropriate, with sigmoid curves, as it describes more than 70% of the lineages growth kinetics. Multivariate analysis reveals that there is similarity between the lineages. The protocol for growing single açai in liquid consistency medium was optimized. The production of friable embryogenic callus has been improved. The strains showed significant differences due to the effect of the compositions of the culture media over time. Oxidation does not prevent the production of friable embryogenic callus. Calli can be multiplied using both Picloram and 2,4-D auxin. Anatomical Analyses reveal that calluses have embryogenic competence.

Keywords: Somatic embryogenesis; liquid medium; biochemical characterization; growth regulator; auxin.

1 INTRODUÇÃO

O açaí é atualmente um dos principais produtos florestais não madeireiro de importância econômica no Brasil. É nativo da Floresta Amazônica e utilizado como alimento básico para muitos povos da Amazônia. O fruto ganhou destaque no Brasil e no mundo devido suas propriedades energéticas, e ainda fonte de minerais, ácidos graxos, antocianinas e antioxidante. Essas propriedades têm aumentado o consumo da polpa do açaí nos últimos anos (SANTANA & COSTA; YUYAMA et al., 2011; IBGE, 2021).

O fruto do açaí é extraído principalmente de duas espécies de palmeiras pertencentes à família Arecaceae: *Euterpe precatoria* Mart., popularmente conhecida como açaí-solteiro, uma vez que possui um único estipe, e, a espécie *Euterpe oleracea* Mart., que apresenta touceira com diversos perfilhos. No entanto, mesmo com um único estipe, o açaí-solteiro produz aproximadamente 4,5 kg de frutos em cada cacho (WADT et al., 2004), enquanto o açaí de touceira produz em média cerca de 2,5 kg de frutos (OLIVEIRA; FERNANDES, 2001).

A espécie *E. precatoria* se destaca em maior representatividade nos estados do Amazonas, Pará, Rondônia e no Acre, com ocorrência natural em terras baixas e firme, muito embora também se encontre em terras altas e áreas sujeita à inundação sazonal (BRASIL, 2018; VIEIRA et al., 2018; FERREIRA, 2020). O açaí-solteiro é uma espécie recalcitrante (BARBEDO & MARCOS FILHO, 1998), perene, com ciclo de vida longo, de reprodução sexuada que necessita de cruzamentos (CARVALHO et al., 1998), resultando em genótipos com características variadas e heterogêneas, o que dificulta o melhoramento genético.

As tecnologias de produção/propagação existentes são insuficientes quando comparada ao potencial econômico do açaizeiro. Isso pode resultar em uma exploração não sustentável do recurso existente com a demanda (TAGORE, 2017), como ocorreu anteriormente na década de 60, na exploração do palmito da palmeira *E. edulis*, conhecida popularmente como juçara. Naquela época, o palmito era produto comercializável de maior valor econômico nas palmeiras.

Dessa forma, com a popularização do açaí, aliada ao aumento constante da demanda expressiva existente pelo fruto, não somente a nível nacional, mas também internacional, torna-se fundamental o desenvolvimento de tecnologias que viabilizem a eficiência da cadeia produtiva, e que conseqüentemente, assegurem oferta do produto com controle de qualidade e agregação de valores.

Tecnologias de propagação vegetativa em açaí ainda são incipientes. Há poucas pesquisas científicas relacionadas à cultura de tecidos de *E. precatoria*, sendo mais comumente encontradas pesquisas envolvendo as espécies *E. oleracea* e *E. edulis* (FARIAS NETO et al.,

2005; SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012; YOKOMIZO et al., 2019; FERREIRA et al., 2020).

Assim, a propagação vegetativa via cultivo *in vitro* surge como alternativa viável para espécies com caracteres agronômicos, uma vez que, em palmeiras, a taxa a multiplicação *in vitro* é maior que por outros métodos convencionais, necessitando menor espaço de tempo e espaço físico para os trabalhos, quando comparado aos métodos convencionais (ASSIS e TEIXEIRA, 1998; NOGUEIRA; FIGUEIRÊDO; MÜLLER, 2005).

Atualmente, pesquisas envolvendo a espécie *E. precatoria*, quando se trata de embriogênese somática vegetal, são desenvolvidas pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-DF, em parceria com a Universidade de Brasília, com a obtenção de resultados promissores e inéditos quanto ao cultivo *in vitro* relacionados à formação de calos embriogênicos. Ferreira et al. (2022a) e Ferreira et al. (2022a) obtiveram êxito no desenvolvimento de protocolo de embriogênese somática para a espécie a partir de embriões zigóticos e tecidos foliares jovens, respectivamente. No entanto, os estudos com embriogênese somática de *E. precatoria* não foram totalmente desenvolvidos, necessitando da otimização do protocolo, especialmente, das fases de multiplicação de propágulos embriogênicos em meio líquido e da regeneração *in vitro*.

O uso de suspensão celular constitui uma técnica empregada na embriogênese somática caracterizada como o cultivo de células ou agregados de células, com elevada taxa de multiplicação (CID, 1998). Isso é possível, uma vez que o meio nutritivo desprovido de agente gelificante garante um melhor contato físico com os materiais cultivados, e uma melhor incorporação e absorção de nutrientes e de água, comparado com o meio semissólido (MONTEIRO et al., 2017; SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012).

Um fator importante do cultivo de *E. precatoria* em meio líquido é a seleção de linhagens com baixa variabilidade natural das células, e, portanto, com características mais homogêneas, que podem ser empregadas para fins de obtenção de material clonal em escala comercial, livres de doenças e patógenos em curto espaço e tempo. Para isso, analisou-se o perfil do crescimento celular e dos agregados celulares em linhagens embriogênicas de *E. precatoria*, aplicando-se a modelagem matemática de Gompertz, importante para estabelecimento e otimização futura de processos embriogênicos da espécie em meios de consistência líquida.

Nesta pesquisa, têm-se as primeiras informações bioquímicas quanto ao acúmulo de proteínas totais e açúcares solúveis totais em linhagens embriogênicas de *E. precatoria*, que podem dar suporte na compreensão dos fenômenos que norteiam o cultivo *in vitro* da espécie.

Com isso, objetivou-se pela primeira vez, o estabelecimento e a multiplicação de culturas embriogênicas em suspensão de *E. precatória* Mart. com vistas ao desenvolvimento de protocolos que otimizem a embriogênese somática a partir do uso de meios nutritivos de consistência líquida.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estabelecer linhagens embriogênicas de açai-solteiro (*Euterpe precatoria* Mart.) em meio de consistência líquida (suspensão celular) e avaliar a cinética do crescimento dessas linhagens.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Estabelecimento das linhagens em meio líquido;
- ✓ Determinar o meio líquido apropriado para multiplicação de linhagens embriogênicas;
- ✓ Comparar as linhagens quanto ao potencial de multiplicação no sistema de cultivo líquido;
- ✓ Verificar a cinética do crescimento por meio da aplicação de modelagem;
- ✓ Selecionar linhagens que apresentem taxa de multiplicação eficiente no sistema líquido;
- ✓ Analisar aspectos bioquímicos e histoquímicos do processo de embriogênese somática em meio de consistência líquida;
- ✓ Caracterizar anatomicamente os processos de embriogênese somática em meio líquido.

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

Euterpe precatoria Mart., EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E CULTIVOS EM
SUSPENSÃO

5 REVISÃO DE LITERATURA

5.1 Caracterização botânica, fenologia e biologia reprodutiva do açáí-solteiro

O açáí solteiro é classificado segundo Alves e Demattê (1987), na seguinte hierarquia:

Divisão: *Magnoliophyta*

Classe: *Liliopsida*

Subclasse: *Arecidae*

Ordem: *Arecales*

Família: *Areaceae*

Subfamília: *Arecoideae*

Gênero: *Euterpe*

Espécie: *Euterpe precatoria* Mart.

A espécie está distribuída desde a América Central, nos países de Belize, Costa Rica, Guatemala, Honduras, Nicarágua e Panamá, até na região norte da América do Sul, nos países Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Guianas, Peru e Trinidad. No Brasil, o açáí-solteiro é encontrado nos estados do Acre, Amazonas, Pará e Rondônia (HENDERSON, 1995).

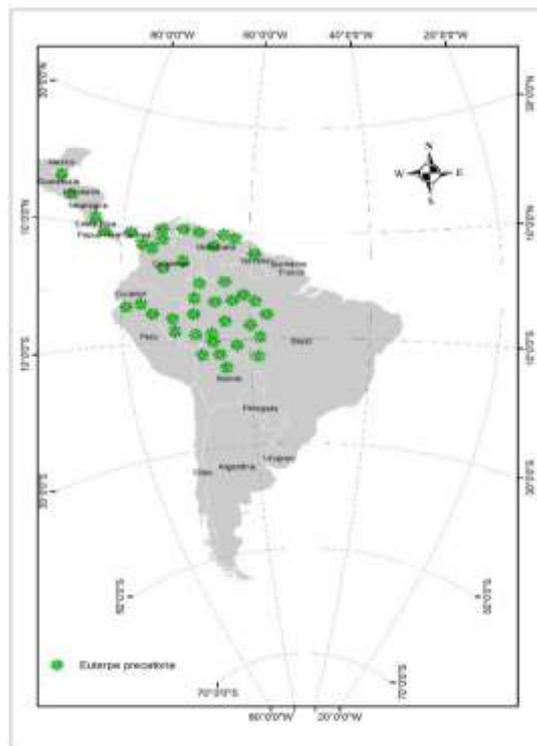


Figura 1. Ocorrência geográfica da espécie *Euterpe precatoria* Mart. Fonte: Adaptado de Ferreira (2020).

O açáí apresenta somente um estipe (caule), com marcas anelares oriundas das bainhas folhas, de cor cinza claro, com diâmetro à altura do peito (DAP) variando de 4 a 23 cm, que

pode atingir até 30 metros de altura. A planta pode apresentar entre 8 e 14 folhas nas copas por indivíduo, sendo planas e pinadas. A bainha é lisa e fechada, de cor verde, podendo atingir até um metro e meio de comprimento, e pecíolo de 51 cm de comprimento. As folhas podem variar entre 10 e 20 cm de tamanho (HENDERSON, 1995; MIRANDA et al., 2001; LORENZI et al., 2010).

As inflorescências são desenvolvidas a partir das axilas foliares, ou seja, na região intrafoliar (LORENZI et al., 2010), por um pedúnculo curto, do tipo espádice (OLIVEIRA; NAVEGANTES; COSTA, 2019). Cada indivíduo pode emitir até quatro inflorescências sucessivas, no período de floração, e após a folha mais velha entrar em senescência (KÜCHMEISTER et al., 1997). As inflorescências são envolvidas por duas brácteas, que também são chamadas de espata ou spatela, de aspecto fusiforme, coriáceo (OLIVEIRA; NAVEGANTES; COSTA, 2019). Os detalhes da inflorescência tanto em *E. oleraceae* quanto em *E. precatória* estão evidenciados na Figura 2.

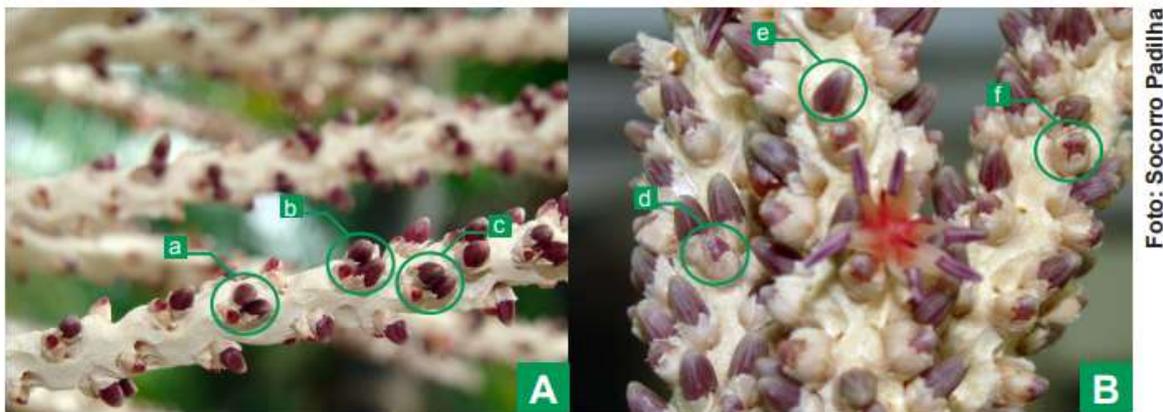


Figura 2. Comparação em detalhe das inflorescências em *Euterpe oleraceae* (A) e *Euterpe precatória* (B), onde “a” e “d” evidenciam o arranjo das tríades, as flores masculinas “b” e “e” e “c” e “f”, flores femininas. Fonte: Oliveira, Navegantes, Costa (2019).

As brácteas, ao se abrirem, expõem os cachos, os quais pesam entre 3 a 8 kg. Os cachos são constituídos por ráquis (eixo central), contendo inúmeras ráquulas (ramificações laterais onde se encontram duas flores masculinas para uma feminina) em número variando de 70 a 150, e, com 35 a 45 cm (CALZAVARA, 1987; NOGUEIRA et al., 1995; OLIVEIRA; CARVALHO; NASCIMENTO et al., 2002). Os aspectos gerais do açáí-solteiro com a presença de inflorescência e infrutescência (cacho) na planta são apresentados na Figura 3.



Figura 3. Aspecto geral do açai-solteiro (A), inflorescência (B) e cacho (C). Fonte: Oliveira, Navegantes, Costa (2019).

As espécies pertencentes ao gênero *Euterpe* são classificadas como monoicas, com dicogamias do tipo protândria, com polinização cruzada, principalmente entomófila (OLIVEIRA; MOCHIUTTI; NETO, 2009). Os polinizadores são atraídos pelas flores masculinas e femininas. Os principais visitantes são coleópteros das famílias Chrysomelidae, Curculionidae e Staphylinidae, e, as abelhas da família Halictidae (HENDERSON & GALEANO 1996; KUCHMEISTER et al. 1997). Anemocoria e a gravidade também são responsáveis pela polinização do açazeiro (OLIVEIRA; MOCHIUTTI; NETO, 2009). As inflorescências de *E. precatoria* são maiores que as inflorescências de *E. oleraceae*, com maior número de ráquilas, mais grossas e com maior número de flores masculinas e femininas (KUCHMEISTER et al., 1997).

O açai pode florescer e frutificar o ano todo, mas o período de safra vai de junho a outubro (FERREIRA, 2005). O ciclo reprodutivo dura 12 meses (GARCIA, 2011), e a fase de reprodução começa entre o quinto e o sétimo ano (OLIVEIRA; NAVAGANTES; COSTA, 2019). A floração ocorre por fases, em que as anteses começam do ápice para base da ráquila, havendo primeiro o período da fase masculina que inicia no dia em que a inflorescência é exposta, permanecendo por um período aproximadamente de 17 dias. A segunda fase é um período chamado de latência, um intervalo de tempo com ausência de anteses que dura entre cinco e seis dias. Em seguida, inicia-se a fase feminina por sete dias, fechando o ciclo, que em média é de 30 dias (KUCHMEISTER et al., 1997; OLIVEIRA, 2002; OLIVEIRA; NAVAGANTES; COSTA, 2019).

A maturação dos frutos ocorre entre sete e oito meses (ROCHA; VIANA, 2004). Os frutos do açáí-solteiro são globosos, com diâmetro variando entre 1,0 e 1,8 cm e coloração púrpuro-negra, constituído de mesocarpo de 1 mm de espessura. O fruto pesa em média 1,5 gramas, contendo uma única semente. O endosperma é homogêneo e sólido. Os frutos do açáí apresentam propriedades nutricionais consideráveis, rico em minerais como boro, cobre, manganês e cromo, vitamina E, proteínas, lipídeos e fibras (SOUZA et al., 2011).

Já as sementes do açáí-solteiro possuem forma globosa, de cor marrom escuro que preenche quase todo o fruto. Cerca de 80% da semente é coberta por fibras, medindo aproximadamente 11,5 mm de diâmetro. As sementes apresentam leve oleosidade no revestimento do fruto, com apenas um poro germinativo (AGUIAR; MENDONÇA, 2003; CLAY; CLEMENT, 1993; HENDERSON, 1995; LORENZI et al., 2010; FERREIRA et al., 2020) e são classificadas como recalcitrantes, apresentando um embrião cônico, indiviso, basal de eixo embrionário curvo. Também apresentam diferenciação no polo caulinar com três primórdios foliares e é indiferenciado no polo radicular (AGUIAR; MENDONÇA, 2003; FERREIRA et al., 2020).

A síndrome de dispersão dos frutos de açáí-solteiro ocorre principalmente de maneira zoocórica, por aves, morcegos, roedores e outros mamíferos terrestres que se alimentam do fruto, levando as sementes para locais mais distantes da planta mãe. Em épocas de inundações, ou quando os indivíduos de açáí-solteiro estão próximos aos rios, pode ocorrer a dispersão via fluvial, considerada um mecanismo muito eficiente. O açáí-solteiro tem características germinativas à sombra, bem como o seu crescimento e desenvolvimento (LIMA, 2014; BRASIL, 2017; BUTZKE, 2019). Os aspectos gerais do fruto e das sementes do açáí-solteiro são apresentados na Figura 4.



Figura 4. Fruto e caroços do açai solteiro (*Euterpe precatória* Mart.). “A” e “B” fruto; “C” caroços; “D” e “F” frutos no cacho. Fotos: Daniel Papa, EMBRAPA ACRE, 2019/2020.

5.2 Propagação vegetativa

A propagação vegetativa constitui uma técnica de multiplicação de plantas assexuada, utilizando órgãos, tecidos e células que dão origem a novos indivíduos com as características genéticas idênticas à planta matriz, sendo considerada uma técnica valiosa na perpetuação e na juvenilidade dos indivíduos (HARTMANN et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2015). Em algumas espécies, a propagação sexuada pode apresentar dificuldades, e a propagação clonal surge como alternativa para a produção em larga escala de mudas uniformes oriundas de matrizes com características superiores (DANTAS et al., 2009).

Por meio da propagação vegetativa, os clones podem ser obtidos por métodos convencionais de macropropagação (estaquia e enxertia) ou pela micropropagação, por meio de cultura de tecidos, utilizando calos, células e órgãos da planta (HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2000). É possível a obtenção de plantas por meio da propagação vegetativa

através de enraizamento, enxertia, estolões e por meio da micropropagação (PASQUAL, 2001; BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2014).

Do ponto de vista comercial, a propagação assexuada é importante em cultivares com características agronômicas superiores, pois gera plantas uniformes, com características altamente favoráveis quanto ao crescimento, floração, frutificação e, conseqüentemente, elevada produção (BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2014). Quanto à propagação *in vitro*, pode-se citar algumas vantagens, como a formação de mudas livre de vírus e demais patógenos e provenientes de genótipos com características desejáveis, sendo adquiridas em menor tempo de propagação quando comparado como a propagação convencional (LAKSHMANAN et al., 2006; SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012).

Quando se trata de micropropagação, utilizam-se os explantes, que podem ser um órgão ou qualquer parte do tecido vegetal, submetidos a tratamentos específicos em isolamento em meio nutritivo sob assepsia total (PASQUAL, 2001). Apesar de ser considerada uma técnica dispendiosa no que se refere à estrutura laboratorial e mão de obra, a propagação *in vitro* possui uma excelente relação custo-benefício, pois é possível produzir em escala comercial, o material selecionado desejável, uniforme que atende diferentes áreas como genética, fisiologia vegetal e fitopatologia (BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2014).

Na cultura de células vegetais, as células totipotentes são as responsáveis pelo desenvolvimento *in vitro* e são consideradas a base da cultura de tecidos vegetais. A totipotência constitui a capacidade de células diferenciadas, desdiferenciarem-se, desenvolvendo um novo indivíduo idêntico à planta mãe. No entanto, a totipotência é variável entre partes das plantas e algumas células, podendo, umas terem maior capacidade de desenvolvimento que as outras (HARTMANN et al., 2011).

Nos últimos anos, propagação *in vitro* via embriogênese somática têm mostrado resultados promissores e com êxito em diferentes palmeiras como coco (*Cocos nucifera*) por Péres-Núñez et al. (2006); dendê (*Elaeis guineensis*) por Beulé et al. (2011); açaí de touceira (*E. oleraceae*) por Scherwinski-Pereira et al. (2012); babaçu (*Attalea speciosa*) por Saleh, Luis e Scherwinski-Pereira (2017); macaúba (*Acrocomia aculeata*) por Meira et al. (2019); gueroba (*Syagrus oleracea*) por Silva-Cardoso et al. (2019), e, recentemente, açaí-solteiro (*E. precatoria*) por Ferreira et al. (2022a, b).

Embora alguns estudos com cultivo *in vitro* sejam mais abrangentes em *E. oleraceae* que em *E. precatoria*, ainda há muitas questões para serem analisadas em relação a multiplicação *in vitro* dessas espécies. Pesquisas recentes foram desenvolvidas com finalidade de utilizar materiais *in vitro* oriundos de folhas e inflorescências imaturas (OLIVEIRA et al.,

2015), uma vez que grande parte dos estudos existentes são limitados a utilização de embriões zigóticos (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012; MENDONZA, 2018).

No entanto, com base nos estudos com cultivo *in vitro* de embrião zigótico, podem-se desenvolver pesquisas com as demais partes da planta (folhas e inflorescência). Essas pesquisas têm sido desenvolvidas pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, com foco no aperfeiçoamento dos protocolos de regeneração tanto por embriões zigóticos como por inflorescências e folhas imaturas (OLIVEIRA et al., 2015), por meio da embriogênese somática. Assim, a embriogênese somática consiste num sistema excelente para propagação clonal (LOPEZ et al., 2017).

As folhas imaturas possuem elevada totipotência, sendo consideradas uma dentre as mais importantes para o cultivo *in vitro* em palmeiras, como o açazeiro, pois proporciona centenas ou milhares de explantes (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2015; FERREIRA et al. 2022a).

As inflorescências imaturas são preferíveis para utilização no cultivo *in vitro*, uma vez que são protegidas pelas espatas. As inflorescências são colocadas de forma individual em placas Petri para formação de calos e demais etapas de cultivo *in vitro*, (SILVA-CARDOSO et al., 2022). As inflorescências apresentam elevado potencial para indução e formação de calos embriogênicos, sendo essas características fundamentais para a propagação clonal (FKI et al., 2011; SILVA-CARDOSO et al., 2019).

Já os embriões zigóticos são considerados propágulos-modelo (FERREIRA et al., 2022b), podem ser usados maduros ou imaturos. É bastante empregado na clonagem, em retrocruzamentos, na produção de plântulas, conservação de germoplasma, resgate de embriões ou criopreservação (OLIVEIRA et al., 2015).

Em geral, para espécies da família Arecaceae, existem fortes interesses pela micropropagação, sobretudo pelo potencial econômico que essas espécies possuem (COSTA; ALOUFA, 2006). Entretanto, micropropagação é realizada por protocolos, desde a indução a aclimatização (LÉDO et al., 2007).

Segundo Mattia (2009), a micropropagação em palmeiras é importante nos avanços tecnológicos para os programas de melhoramento, principalmente se a espécie tiver valor comercial, ou se houver dificuldade de desenvolvimento pelos métodos convencionais.

Assim sendo, a técnica de propagação de plantas *in vitro* possibilita a produção desejável, de menor impacto ambiental e contribui para vantagens competitivas entre os países que praticam essa tecnologia. A exemplo, é a cultura de tecidos na floricultura, que gera bilhões

de dólares em arrecadação, além de empregos, renda e material clonal de elite, livres de doenças e resistentes aos fatores sazonais (BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2014).

5.3 Embriogênese somática

A embriogênese somática (ES) constitui um exemplo clássico da expressão da totipotência celular, possibilitando a regeneração de uma planta por completo (ZIMMERMANN, 2014). Em outras palavras, a ES é considerada um processo indutivo, em que para formação do embrião somático, uma única célula ou um grupo de células passam por várias mudanças fisiológicas, bioquímicas e moleculares (RAI et al., 2011; KRISHNAN e SIRIL, 2017).

As células somáticas se desenvolvem podendo formar estruturas bipolares capazes de se regenerar e formar uma nova planta. Isso ocorre em resposta a estímulos endógenos, também chamado de diferenciação celular. Para a formação de embriões somáticos, as células diferenciadas têm que se desdiferenciar após o processo de divisão celular (MOZGOVÁ et al., 2017; MÉNDEZ-HERNÁNDEZ, et al., 2019), para se tornarem células embriogênicas e depois serem rediferenciadas (PASQUAL et al., 1997).

Assim, a embriogênese somática envolve dois estádios. Um estágio ocorre por meio da expressão da totipotência a partir das etapas de desdiferenciação, do qual é chamado de indução embriogênica, que ocorre mediante o efeito de reguladores de crescimento (FEHÉR, 2015; ELHITI; STASOLLA, 2016). Dessa forma, todo esse processo é desencadeado em resposta à uma sinalização, que provoca a indução e assim determinará a programação da célula (KRISHNAN e SIRIL, 2017; MÉNDEZ-HERNÁNDEZ, et al., 2019). No entanto, a indução só ocorre quando as células somáticas apresentam a totipotência e alcançam a competência para reagir aos estímulos embriogênicos e começar de fato a embriogênese (PASTERNAK et al., 2002).

O outro estágio é o desenvolvimento, ou seja, é a capacidade da expressividade embriogênica, resultando na formação e desenvolvimento completo do embrião a partir células não zigóticas (ZIMMERMANN, 2014; ELHITI; STASOLLA, 2016).

É esse potencial presente nas células dos vegetais que torna possível a reprodução maciça de várias espécies de vegetais, mantendo-se a integridade das características genéticas das plantas (ZIMMERMANN, 2014). Há inúmeras pesquisas voltadas para melhor elucidar essa técnica de regeneração de plantas, mas ainda é uma das menos compreendidas, visto que os mecanismos em nível celular ainda são pouco claros (MÉNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019).

São inúmeras as aplicações da ES, em que pode-se citar a regeneração de plantas, propagação clonal, indução e seleção de mutantes, formação de híbridos somáticos (GAJ, 2004), bem como subsídio à transformação genética (ZENG et al., 2006) e à conservação via criopreservação (VON ARNOLD et al., 2002). Entretanto, dentre as aplicações da ES, a utilização na propagação clonal massiva é mais interessante no que se refere a reprodução de culturas comerciais (VON ARNOLD et al., 2002), sobretudo, em diversas palmeiras, dado o fato da dificuldade de propagação convencional e a escassez de genótipos superiores (SILVA-CARDOSO, 2018).

Os fatores que influenciam o sucesso do cultivo *in vitro*, que estão ligados à indução da ES, são a origem e idade da planta, as condições do meio de cultura, o tipo de explante (raízes, folhas, ápices caulinares, discos foliares, hipocótilos e outros), as altas concentrações dos reguladores de crescimento vegetal, o corte e a posição do explante, as condições fisiológicas de incubação, a densidade celular no caso de cultivos em suspensão, e também a geração de agregados celulares homogêneos e outros fatores difíceis de serem controlados, uma vez que cada planta responde de maneira diferenciada (CARVALHO et al., 2006; PENCİK et al., 2015 ; LOYOLA-VARGAS; OCHOA-ALEJO, 2016; GRZYB et al., 2018).

Os primeiros estudos realizados com ES ocorreram no ano de 1958, descrito por Reinert e Steward et al. (1958), com cenoura (*Daucus carota*), modelo ainda muito utilizado devido a sua eficiência (ZIMMERMANN, 2014). Staritsky (1970) foi o pioneiro na embriogênese somática em palmeiras, trabalhou com cultivo *in vitro* do dendê (*Elaeis guineensis*).

A ES pode ocorrer de duas maneiras: direta e indireta. A ES direta ocorre quando o embrião surge diretamente do explante, e nesse caso, não há desdiferenciação (GAJ, 2004; CARVALHO et al., 2006; FEHÉR, 2008). Segundo Zimmermann (2014), isso ocorre devido a existência de células somáticas competentes ou pré-embriônicas, que possuem capacidade de desenvolver embriões com pouca reprogramação em relação à ES indireta.

Já na ES indireta, ocorre a desdiferenciação, havendo primeiramente a formação do calo e, em seguida, a indução do embrião a partir dos calos. A ES indireta é a que ocorre com maior frequência (GAJ, 2004; CARVALHO et al., 2006; FEHÉR, 2008). Em palmeiras, a ES indireta é a maneira mais eficiente de micropropagação (REE; GUERRA, 2015) e envolve várias etapas, com início na formação de calos (primários e embriogênicos), evoluindo para prembriogênicos e depois há o surgimento dos embriões somáticos, que maturam e germinam (formação da planta) (VON ARNOLD et al., 2002).

Durante o processo de ES, os embriões apresentam mudanças visíveis ao se desenvolverem, apresentando os estágios comuns da embriogênese zigótica. Assim, nas

dicotiledôneas ocorrem os estádios globulares, cordiformes e torpedos; nas monocotiledôneas ocorrem os estádios globular e cotiledonar; e em coníferas ocorrem os estádios globulares, cotiledonar precoce e tardio (TOONEN; VRIES, 1996; DONG e DUSNTAN, 2000; CARVALHO et al., 2006). Em palmeiras, os embriões somáticos são similares aos embriões zigóticos tanto nas características morfológicas, quanto nas características moleculares e bioquímicas, e desenvolvem estrutura bipolar com ápice caulinar (PEREIRA et al., 2007).

A ES ocorre normalmente nas seguintes fases: a) indução; b) multiplicação; c) maturação e d) germinação. Após procedimentos de assepsia e inoculação dos explantes, inicia-se a fase de indução (GUERRA; NODARI, 2006), que pode ser direta ou indireta (GUERRA, 1989). A partir de um desenvolvimento gradativo chamado morfogênese, inicia-se a indução (GUERRA; NODARI, 2006). Os explantes são colocados sob estímulos físicos, químicos e biológicos, havendo reprogramação das células por intermédio das modificações gênicas desenvolvidas pelos explantes (MERKLE et al., 1995; LOYOLA-VARGAS et al., 1999).

Na fase de indução, usam-se explantes juvenis ou maduros, em meios de cultura semissólidos, com elevado nível de auxinas, como ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftaleno acético (ANA) e ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (Picloram) (GUERRA; HANDRO, 1998; STEINMACHER et al., 2007) adicionando ou não as citocininas 6-benzilaminopurina (BAP), Tidiazuron (TDZ) e cinetina (KIN) (REY; MROGINSKI, 2006; JOGESWAR et al. 2007; STEINMACHER et al. 2007).

Essas combinações de auxinas e/ou citocininas no meio de cultura fazem com que células somáticas diferenciadas alcancem a competência celular embriogênica, seja essa, de forma direta ou indireta (ZAVATTIERI et al., 2010). Segundo Guerra (1989), a competência celular embriogênica é o potencial que o explante possui de expressar a indução, seja por transformações na competência (diretiva), seja por meio de uma resposta particular de diferenciação (permissiva).

Quando as células embriogênicas se desenvolvem nos calos na fase de indução, com a presença de reguladores de crescimento e/ou submetida a estresses, pode ocorrer a proliferação e formação de massas proembriogênicas (YANG; ZAHNG, 2010). Assim, a concentração desses reguladores de crescimento em cada cultura irá influenciar na indução dessas massas embriogênicas no processo da ES (MÁRQUEZ-LÓPEZ et al., 2018).

A elevada concentração de auxinas no meio de cultura constitui o principal estresse para as células durante a indução de SE. Também são usados choque térmicos e pH elevado e substâncias químicas, como fonte de estresse para indução da ES. A combinação de estresse físicos com níveis elevados de auxinas também podem melhorar as responsividade

embriogênica (CUEVA AGILA et al., 2015). Após induzidas, há formação de embriões a partir dessas massas nas monocotiledôneas, que passam tipicamente pelos estádios da embriogênese zigótica globular, escutelar e coleoptilar (JIMÉNEZ, 2005).

A multiplicação consiste numa fase que permite estabelecer circunstâncias satisfatórias para o estabelecimento de repetitivos ciclos de divisão celular e com equilíbrio das vias de diferenciação, de tal forma que as estruturas sejam compostas por embriões somáticos globulares ou proembriões em estádios iniciais de desenvolvimento. A multiplicação é fundamentada para que calos embriogênicos continuem originando embriões somáticos ao longo de muitas subculturas, em períodos prolongados (BARTOS, 2018). É na fase de multiplicação que ocorre a produção clonal para escala comercial, ou seja, produção em larga escala, a partir da multiplicação dos calos embriogênicos (MELO, 2011).

Na multiplicação, os níveis de reguladores de crescimento adicionados aos meios de cultura são reduzidos (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999; GORRET et al., 2004). De acordo com Gupta et al. (1993), nessa fase pode-se utilizar células em suspensão (meio líquido), com reguladores em concentração média variado de 2 a 5 μM para auxinas e citocininas. Biorreatores e Erlenmeyers são comumente utilizados na fase de multiplicação, em condições de agitação por meio do uso de agitador rotatório (ZOUINE; EL HADRAMI, 2007). Além de fatores genéticos e fisiológicos, os meios nutritivos são fundamentais no sucesso da multiplicação, sendo necessárias também condições adequadas de luz e temperatura para o estabelecimento da cultura (LEITZKE et al., 2010).

A fase da maturação ocorre após a diferenciação dos embriões somáticos, iniciando o primeiro processo metabólico dessa fase, um processo morfogenético, em que os embriões desenvolvem-se passando por uma fase amadurecimento, havendo modificações morfológicas dos quais são resultantes de ações fisiológicas que desencadeiam o crescimento e a maturação é iniciada (VON ARNOLD et al., 2002; PILA QUINGA et al., 2018).

O segundo processo metabólico é caracterizado por atividades fisiológicas que interrompem os ciclos repetitivos de divisão celular e iniciam-se os processos e bioquímicos, relacionados com acúmulo de substâncias, tais como lipídeos, proteínas e aminoácidos. Essas substâncias são essenciais no desenvolvimento dos embriões. Neste última fase, os embriões somáticos atingem a maturidade morfológica e fisiológica, o que garante um desempenho pós-embriônico satisfatório (BORÉM, 2007; PILA QUINGA et al., 2018).

Na maturação, os cotilédones desenvolvem-se rapidamente. Nessa fase, a síntese e o acúmulo e das substâncias de reservas são fundamentais na conversão eficiente dos embriões somáticos em plantas completas (MISHRA; SANYAL; AMLA, 2012). No entanto, há

palmeiras que não apresentam adequadamente a produção de algumas substâncias, como por exemplo as proteínas (MOURA; VENTRELLA; MOTOIKE, 2010; SILVA-CARDOSO et al., 2019).

Contudo, Merkle, Parrott e Flinn (1995) afirmam que essa deficiência não é considerada um problema particular da embriogênese somática, mas sim uma estratégia de maturação para desenvolvimento dos embriões somáticos. Para tanto, uma maturação defeituosa pode resultar em problemas na germinação das plântulas ou germinação precoce. Assim, é necessário a utilização de suplemento de reguladores de crescimento nos meios nutritivos, como por exemplo a utilização do ácido abscísico (ABA) (JIMÉNEZ, 2005; FRAGA et al., 2016).

Na fase de germinação, os embriões são transferidos para meios de culturas sem reguladores de crescimento. Também chamada de regeneração ou conversão, os embriões adquirem a capacidade de desenvolverem raízes primárias, meristema caulinar apresentando os primórdios foliares, hipocótilo e cotilédones. Os embriões somáticos maduros germinam, ou seja, nessa etapa ocorre a formação da planta completa (MERKLE; PARROTT; FLINN, 1995; SWATI et al., 2001; GAJ, 2004).

5.5 Cultivos em suspensão, modelagem e parâmetros cinéticos

O cultivo em suspensão é realizado a partir da transferência de calos friáveis, que foram cultivados em meio semissólido, para um meio de consistência líquida (CUSIDO et al., 2014). Calos friáveis apresentam divisão celular em nível elevado, são facilmente separáveis, fato que favorece uma melhor homogeneização das culturas (CHAWLA, 2009). No cultivo em suspensão, as condições de temperatura, luz e aeração, sob movimento contínuo (agitação) são mantidas adequadamente para evitar diferenças nutricionais e gasosas no meio de cultivo (BARRUETO CID, 1998; CUSIDO et al., 2014).

Sob essas condições, as células ou agregados de células ficam dispersas no líquido em agitação, possibilitando uma maior superfície de contato, favorecendo o crescimento da biomassa vegetal (WANG et al., 2017; TEXEIRA, 2017). O cultivo em suspensão apresenta vantagens por favorecer a velocidade de multiplicação dos cultivos, melhor incremento de biomassa e também as melhores condições de inoculação e manipulação (SZABADOS; MROGINSKI; ROCA, 1991; CUSIDO et al., 2014).

O crescimento celular ou dos agregados celulares constitui um fator que necessita de supervisão e monitoramento a partir de métodos que viabilizem a quantificação eficaz, garantindo padrão de qualidade na mensuração. A contagem de células, a centrifugação e o volume da sedimentação, o peso da massa fresca e seca são exemplos de métodos quantitativos

eficazes utilizados nos cultivos em suspensão (MATSUMOTO, 2006; KHANPOUR-ARDESTANI et al., 2015).

Assim, por meio dos métodos de quantificação das células e agregados celulares, pode-se determinar as seguintes fases de crescimento: fase de latência (lag), fase exponencial ou logarítmica (log), fase linear, estacionária ou platô e senescência.

Na fase lag ou latência, os incrementos ocorrem em pequenas proporções de número de células, uma vez que a divisão celular ocorre de forma muito baixa, sendo assim, uma fase de pouquíssima incrementação de volume celular. Para tanto, ressalta-se que a densidade do inóculo é fundamental para um menor tempo possível nessa fase, visto que quanto menor o peso de material genético inoculado, maior tempo da fase de latência (ALVES et al., 2010).

A fase exponencial ou logarítmica (log) é caracterizada pelo início exponencial da multiplicação celular (aumento do número de células), pela intensa e contínua divisão celular, sendo também definida por apresentar formação de agregados pequenos (CHAWLA, 2009). Na fase linear, há a redução da divisão celular, ocorrendo um novo comportamento, que é aumento do volume (GEORGE et al., 2008; ALVES et al., 2010).

É na fase estacionária ou também chamada de platô, que ocorre a desaceleração da divisão celular, onde as culturas apresentam elevada densidade, sendo interrompido o crescimento celular (FRESHNEY, 2011; SILVA; GOUVEIA; DONATO, 2020). Na fase de declínio, ocorre o início da morte celular, que não está ligado à redução dos nutrientes, mas sim pela perda de células viáveis que ocorre devido ao curso natural do ciclo celular (MERCK, 2018).

As fases podem não ocorrer necessariamente nessa ordem, como é o caso da figura abaixo, reportando algumas fases na palmeira tamareira (*Phoenix dactylifera* L.) (Figura 9). Assim, o crescimento dos cultivos em suspensão não apresenta um padrão uniforme e isso ocorre porque os estágios de crescimento são influenciados por diferentes fatores como: a espécie, linhagem, explante, meio nutritivo, subcultivos, dentre outros (MUSTAFA et al., 2011).

No crescimento celular, há ainda a aplicação de modelagem matemática que pode fornecer as condições específicas para cada tipo de linhagem pesquisada, uma vez que, a modelagem garante a simulação do comportamento dos cultivos em relação às diferentes circunstâncias (VILLEGAS, 2017).

Aliado a isso, por meio da aplicação de modelos matemáticos, pode-se inferir sobre a cinética celular, com auxílio dos coeficientes dados pelo modelo, oriundos da coleta de dados experimentais. Dessa forma, é possível observar a dinâmica dos sistemas de cultivo e das interações que ocorrem ao longo do tempo (OMAR et al., 2006).

Então, a cinética do crescimento é avaliada quando se aplica um modelo sigmoide, a exemplo do de Gompertz. Esse modelo vem sendo muito aceito e utilizado por inúmeros autores para determinar curvas sigmóides de crescimento celular ou de agregados celulares na cultura de tecidos, visto que além da curva, pode-se inferir os parâmetros cinéticos que são: (G) tempo de regeneração das células (dia); (μ_{max}) taxa de crescimento específico máxima medido em (dia^{-1}); e (λ) tempo de latência (dia) (BRILHANTE, 2018; LÓPEZ-VÁZQUEZ, 2019).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, M.O.; MENDONÇA, M. S. Morfo-anatomia da semente de *Euterpe precatoria* mart. (Palmae). **Revista brasileira de sementes**, vol. 25, nº 1, p.37-42, 2003.
- AL-KHAYRI, J.M. Determination of the date palm cell suspension growth curve, optimum plating efficiency, and influence of liquid medium on somatic embryogenesis. **Emir. J. Food Agric.** 2012. 24 (5): 444-455.
- ALVES, M.R.P.; DEMATTÊ, M.E.S.P. **Palmeiras**: características botânicas e evolução. Campinas: Fundação Cargill, 1987.
- AMARAL, L. I. V.; COSTA, P. M. F.; AIDAR, M. P. M.; GASPAR, M. BUCKERIDGE, M. S. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Hoehnea**, v.34, p.425-431, 2007.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B E CARMELLO-GUERREIRO, S.M. **Anatomia Vegetal**. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa, UFV. 2003. 438p.
- ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C. CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Embrapa-cnph, 1998. p.261-296.
- AVALOS, G.; SCHNEIDER, R. A. Quantification of ramet production in the Neotropical palm *Euterpe precatoria* (Arecaceae) in Costa Rica. **Ecotropica**, Frankfurt, v. 17, n. 2, p. 31-38, 2011.
- AZÊVEDO, H. S. F. S. **Estudo da diversidade genética de populações naturais de açazeiro (*Euterpe precatoria* Mart.)**. 2019. 80 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia), Rede Bionorte, Fundação Oswaldo Cruz, Porto Velho, 2019.
- BARRUETO CID, L. P.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: BARRUETO CID, L. P. **Cultivo in vitro de plantas** (3ª ed.) Brasília: EMBRAPA, 2014. p. 17- 45.
- BARBEDO, C. J.; MARCOS-FILHO, J. Tolerância a dessecação de sementes. **Revista Acta Botânica Brasileira**, v.12, n.2, p.145-164, 1998.
- BARTOS, P. M. C.; GOMES, H. T.; AMARAL, L. I. V. Do.; TEIXEIRA, J. B.; Scherwinski-Pereira, J. E. Biochemical events during somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. **3 Biotech**, v. 8, p. 209, 2018.
- BENTES-GAMA, M. M.; RIBEIRO, G. D.; FERNANDES, C. De F.; MEDEIROS, I. M. **Açaí (*Euterpe spp.*)**: características, formação de mudas e plantio para a produção de frutos. EMBRAPA, 2005. 6p. (Circular Técnica, 80).
- BERNABÉ-ANTONIO, A.; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, A.; ROMERO-ESTRADA, A.; MEZA-CONTRERAS, J.C.; SILVA-GUZMÁN, J.A.; FUENTES-TALAVERA, F.J.;

HURTADO-DÍAZ, I.; ALVAREZ, L.; CRUZ-SOSA, F. Establishment of a Cell Suspension Culture of *Eysenhardtia platycarpa*: Phytochemical Screening of Extracts and Evaluation of Antifungal Activity. **Plants** 2021, 10, 414. <https://doi.org/10.3390/plants10020414>

BEULÉ, T. et al. Transcriptome analysis reveals differentially expressed genes associated with the mantled homeotic flowering abnormally in oil palm (*Elaeis guineensis*). **Tree Genet Genomes**, v. 7, p. 169-182, 2011.

BONA, C.M.; SANTOS, G.D.; BIASI, L.A. Lavandula calli induction, growth curve and cell suspension formation Revista Brasileira de Ciências Agrárias, vol. 7, n. 1, pp. 17-23, 2012.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região Nordeste**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, 2018. 1311 p.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Extrativismo e Desenvolvimento Rural Sustentável. Departamento de Extrativismo. **Açaí: boas práticas para o extrativismo sustentável orgânico / Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Extrativismo e Desenvolvimento Rural Sustentável. Departamento de Extrativismo**. Brasília: MMA, 2017. 54 p.

BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1956.

BORÉM, A. **Biotecnologia florestal**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora. 2007.

BHATIA, S., 2015. Plant tissue culture. In: Bhatia, S., Sharma, K., Dahiya, R., Bera, T. (Eds.), *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*, first ed. Academic Press, Boston, pp. 31–107. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802221-4.00002-9>.

BUSSMANN, R.W.; ZAMBRANA, N.Y.P. 2012. Facing global markets – usage changes in Western Amazonian plants: the example of *Euterpe precatoria* Mart. and *E. oleracea* Mart. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, 81: 257-261.

BUTZKE, A. G. **Produção de mudas de açaizeiro solteiro (*Euterpe precatoria* Mart.) sob diferentes doses de nitrogênio e potássio**. 2019. 74f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal do Acre, Rio Branco, AC, 2019.

CALZAVARA, B.B.G. **Açaizeiro**. Belém. EMBRAPA/CPATU, 1987. 6p. (EMBRAPA/CPATU. Recomendações Básicas, 3).

CARVALHO, J. E. U. de; NASCIMENTO, W. M. O. do; MÜLLER, C. H. **Características físicas e de germinação de sementes de espécies frutíferas nativas da Amazônia**. Belém: Embrapa-CPATU, 1998. 18p. (Boletim de Pesquisa, 203).

CARMONA, R.L.; ROJAS, L.M.; AURA, I.U.T.; ATEHORTÚA, G.L. Effect of nutrients starvation in the cell cycle synchronization of cell suspension cultures of *Jatropha curcas* L. **Curr. Plant Biol.** 2018, 13, 23–31.

CARVALHO, J. M. F. C.; LIMA, M. M. A.; AIRES, P. S. R.; VIDAL, M. S.; PIMENTEL, N. W. **Embriogênese somática**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. (Embrapa Algodão. Documentos 152). 36 p.

CHAWLA, H. **Introduction to Plant biotechnology**. 3. ed. [s.l.] Science Publishers, 2009.

CLAY, J. W.; CLEMENT, C. R. **Selected species and strategies to enhance income generation from Amazonian forests**. Rome: Food and agriculture organization of the united nations, 1993.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Histórico mensal de açaí**. Brasília, DF: CONAB, 2020. 9p. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-acai>> acesso: 27 de julho de 2022.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Histórico mensal de açaí**. Brasília, DF: CONAB, 2021. 9p. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-acai>> acesso: 27 de julho de 2022.

COSTA, E. L. da. **Pode o açaí (*Euterpe precatoria* Mart.) ser parte importante no desenvolvimento socioeconômico das famílias extrativistas no Acre, Brasil?** 2017. 59 p. Dissertação (Mestrado em Análise e Modelagem de Sistemas Ambientais), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.

COSTA, N. M. de S.; ALOUFA, M. A. I. Organogênese direta de *Phoenix dactylifera* L. via pecíolo cotiledonar. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 36, n. 3, p. 195-198, 2006.

DANTAS, A. C. V. L.; COSTA, M. A. D. de C.; SANTOS-SEREJO, S. A. S. J. A. dos. Propagação de fruteiras potenciais para o nordeste brasileiro. **Tópicos em Ciências Agrárias**, v. 1, UFRB, p. 26-35, 2009.

DEEPTHI, S.; SATHEESHKUMAR, K. Cell line selection combined with jasmonic acid elicitation enhance camptothecin production in cell suspension cultures of *Ophiorrhiza mungos* L. **Appl Microbiol Biotechnol**. 2017 Jan;101(2):545-558. doi: 10.1007/s00253-016-7808-x.

DÍAZ, R. O.; CARDONA, J. E. C.; CARRILO, M.; HERNÁNDEZ, M. S.; FERNÁNDEZ TUJILLO, J. P.; GUTIÉRREZ, R. H.; LARES, M. Postharvest Handling and Uses of Asaí (*Euterpe precatoria*) Fruit. **Acta Horticulturae**, Korbeek-Lo, v. 1047, n. 2, p. 269-274, 2014.

DONG, J. Z.; DUNSTAN, D.I. Molecular biology of somatic embryogenesis in conifers. In: JAIN, S.M.; MINOCHA, S.C. (Eds), **Molecular biology of woody plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. p. 51–87.

DOYLE, J.J.; DOYLE J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350-356, 1956.

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.

FARIAS NETO, J. T. et al. Variabilidade Genética Em Progenies Jovens De Açaizeiro. **Revista Cerne**, v. 11, p. 336–341, 2005.

FEHÉR, A. The initiation phase of somatic embryogenesis: what we know and what we don't. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 52, n.1.p. 53-56, 2008.

FEHÉR, A. Somatic embryogenesis – stress-induced remodeling of plant cell fate. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1849, n. 4, p. 385-402, 2015.

FERREIRA, C. D.; SILVA-CARDOSO, I. M. De A.; FERREIRA, J. C. B.; COSTA, F.H.S.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Morphostructural and histochemical dynamics of *Euterpe precatoria* (Arecaceae) germination. **J Plant Res**, vol. 133, p. 693–713, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10265-020-01219-7>.

FERREIRA, E. Açaí: *Euterpe precatoria* Mart. In: SHANLEY, Patrícia. **Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Amazônica**. Belém: CIFOR, Imazon, 2005.

FERREIRA, J. C. B. **Embriogênese Somática de Açaí Solteiro (*Euterpe precatoria* Mart.)**. 2020. 259f. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências Florestais) - Universidade de Brasília, DF, 2020.

FERREIRA, J.C.B., DE ARAÚJO SILVA-CARDOSO, I.M., MEIRA, R.O. et al. Towards development of an efficient somatic embryogenesis protocol for the palm tree *Euterpe precatoria* (Mart.) from leaf tissues of adult plants. **In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant** 58, 750–768, 2022a. <https://doi.org/10.1007/s11627-022-10310-8>

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

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, 2016.

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

GALLEGO, A.; BONFILL, M.; CUSIDO, R.M.; PASTOR, M.; PALAZON, J.; MOYANO, E. Assessing factors that affect the growth of *Corylus avellana* cell suspension cultures: a

statistical approach. **In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant** 51, 530–538 (2015).
<https://doi.org/10.1007/s11627-015-9693-x>

GARCÍA, A. **Documento Fenología reproductiva de três espécies de palmas amazônicas en el centro de formación el trueno proyecto**: Investigación, innovación y alternativas tecnológicas de Aprovechamiento sostenible de los recursos naturales renovables y el medio ambiente amazónico. Programa: Sostenibilidad e intervención. Instituto “SINCHI”, 2011.

GOMES, H. T.; BARTOS, P. M. C.; SILVA, C. O.; AMARAL, L. I. V.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Comparative biochemical profiling during the stages of acquisition and development of somatic embryogenesis in African oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Growth Regulation**, v.74, p.199-208, 2014.

GORRET, N.; ROSLI, S. K. B.; OPPENHEIM, S. F.; WILLIS, L. B.; LESSARD, P. A.; KHA, C.; SINSKEY, A. J. Bioreactor culture of oil palm (*Elaeis guineenses*) and effects of nitrogen source, inoculums size, and conditioned médium on biomass production. **Journal of Biotechnology**, v. 108, p. 253-263, 2004.

GOYAL, A. K. et al. Micropropagation and assessment of genetic fidelity of *Dendrocalamus strictus* (Roxb.) nees using RAPD and ISSR markers. **Biotech**, v. 5, n. 4, p. 473–482, 2015.

GUERRA, M. P. **Embriogênese somática em *Euterpe edulis* Mart. (Palmae)**. 1989. Tese de Doutorado (Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo). São Paulo, 1989.

GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo cultures of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). **Plant Cell Report**, v.7, p.550-552, 1998.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA: CBAB, 1999. v. 2, p. 533-568.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Apostila de biotecnologia**: introdução ao conceito de biotecnologia. LFDG/CCA-UFSC: D. A. Steinmacher. 2006, p. 41. (Material de apoio).

GUILLOU, C., FILLODEAU, A., BRULARD, E.; BRETON, D.; MARASCHIN, S.F.; VERDIER, D.; SIMON, M. DUCOS, J.-P. Indirect somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. in liquid medium and improvement of embryo-to-plantlet conversion rate. **In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant** 54, 377–391 (2018). <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9909-y>

GUPTA, P. R.; TIMMIS, R.; CARLSON, W. C. Somatic embryogenesis: a possible tool for large-scale propagation of forestry species. In: SOH, W. Y.; LIU, J. R.; KOMANING, A. (eds). **Advances in Developmental Biology and Biotechnology of Higher Plants**. Korean Soc. Plant, Tissue, Culture, p. 18-37, 1993.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; JUNIOR DAVIES, F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation**: principles and practices. 8.ed. New Jersey: Englewood Clippis, 2011.

HENDERSON, A. **The palms of the Amazon**. Oxford: University Press, 1995.

HENDERSON, A.; GALEANO, G. *Euterpe*, *Prestoea*, and *Neonicholsonia* (**Palmae: Euterpeinae**). New York: New York Botanical Garden, 1996.

HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. A.; GONÇALVES, A. N. **Propagação vegetativa de Eucalyptus**: princípios básicos e a sua evolução no Brasil. Instituto de pesquisas e Estudos Florestais, n. 192, p. 14, 2000. (Circular Técnica).

HUA, M.; HUA, Z.; DUA, L.; DU, J.; LUO, Q.; XIONG, J. Establishment of cell suspension culture of *Lonicera japonica* Thunb and analysis its major secondary metabolites. **Industrial Crops and Products**, v.137, p. 98-104, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.05.024>

HUSSEIN, S.; HALMI, M.I.E.; LING, A.P.K. Modelling the growth kinetics of callus cultures from the seedling of *Jatropha curcas* L. according to the modified Gompertz model. **J. Microbiol. Biotechn.** 2016, 4, 20–23.

IBGE. **Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura**. Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: < <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pevs/quadros/brasil/2019>>. Acesso em: 28 de julho de 2022.

IBGE. **Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura**. Rio de Janeiro, 2021. Disponível em: <https://www.aen.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/migrados/0610pevs_2020_v3_5_informativo.pdf>. Acesso em: 28 de julho de 2022.

IBGE. **Produção Agrícola Municipal**. Rio de Janeiro, 2020. v. 34. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457#resultado>>. Acesso em: 28 de julho de 2022.

IBGE. **Produção Agrícola Municipal**. Rio de Janeiro, 2021. v. 34. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pevs/quadros/brasil/2020>>. Acesso em: 28 de julho de 2022.

IGIELSKI, R.; KEPCZYŃSKA, E. Expressão gênica e perfil metabólico da biossíntese de giberelinas durante a indução de embriogênese somática em *Medicago truncatula* Gaertn. **PLOS ONE**, California, v. 12, n. 7, p. 1-19, 2017.

JAMIL, S.Z.M.R., ROHANI, E.R., BAHARUM, S.N. et al. Metabolite profiles of callus and cell suspension cultures of mangosteen. **3 Biotech** 8, 322 (2018). <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1336-6>

JESUS, R.L.; OLIVEIRA, M.S.P. Monitoramento fenológico do açaí-do-amazonas (*Euterpe precatoria* MART.) nas condições de Belém, PA. 18º Seminário de Iniciação Científica e 2º Seminário de Pós-graduação da Embrapa Amazônia Oriental. 12 a 14 de agosto de 2014, Belém-PA.

JIE, E.Y., AHN, M.S., LEE, J.; CHEON, Y.I.; KIM, C.Y.; KIM, S.W.. Establishment of a high-frequency plant regeneration system from rhizome-derived embryogenic cell-suspension cultures of *Curcuma longa* L. **Plant Biotechnol Rep** 13, 123–129 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11816-019-00519-2>

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.

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.

JOGESWAR, G.; RANADHEER, D.; ANJALIAH, V.; KISHOR, P. B. K. High frequency somatic embryogenesis and regeneration in different genotypes of *Sorghum bicolor* (L.) Moench from immature inflorescence explants. **In Vitro Cellular Developmental Biology Plant**, v. 43, p. 159-166, 2007.

JOHANSEN, D. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill, 523 p. 1940.

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.

KONG, E. Y. Y.; BIDDLE, J.; FOALE, M.; ADKINS, S. W. Cell suspension culture: A potential *in vitro* culture method for clonal propagation of coconut plantlets *via* somatic embryogenesis. **Industrial Crops and Products**, v. 147, n. 112125, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112125>

KÜCHMEISTER, H.; GOTTSBERGER, I. S.; GOTTSBERGER, G. Flowering, pollination, nectar standing crop, and nectaries of *Euterpe precatoria* (Arecaceae) an Amazonian rain forest palm. **Plant Systematic Evolution**, v.206, p. 71-97, 1997.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSRES, R. J.; WANG, L.; ELLIOTT, A.; GROF, C. P. L.; BERDING, N.; SMITH, G. R. Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids) leaf culture. **Plant Cell Reports**, v. 25, p. 1007-1015, 2006.

LAURENS, L. M.; QUINN, M.; VAN WYCHEN, S.; TEMPLETON, D. W.; WOLFRUM, E. J. Accurate and reliable quantification of total microalgal fuel potential as fatty acid methyl esters by in situ transesterification. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.403, p.167-178, 2012.

LÉDO, A. da S.; GOMES, K. K. P.; BARBOZA, S. B. S. C. B.; VIEIRA, G. S. S. V.; TUPINAMBÁ, E. A.; ARAGÃO, W. M. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de coqueiro-anão. **Pesq. Agropec. Bras**, Brasília, v. 42, n. 2, p. 147-154, 2007.

LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Influência do meio de cultura, tipo e concentração de citocininas na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 352-360, 2010.

LIMA, P. P. **Caracterização da variabilidade genética, sistema de cruzamento e parâmetros de germinação e emergência de *Euterpe precatoria* Martius em populações do baixo rio Solimões**. 2014. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014.

LING, A.P.K.; HALMI, M.I.E.; HUSSEIN, S; ONG S.L. Modelling the Effect of 2-4, D on the Growth Kinetics of Cell Suspension Cultures of *Ficus deltoidea* L. **JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY**, v. 3, n. 2, p. 1-5, 2015.

LOPES, E.; SOARES-FILHO, B.; SOUZA, F.; RAJÃO, R.; MERRY, F.; RIBEIRO, S. C. Mapping the socio-ecology of Non-Timber Forest Products (NTFP) extraction in the Brazilian Amazon: The case of açai (*Euterpe precatoria*) in Acre. **Landscape and Urban Planning**, Amsterdam, v. 188, n. 1, p. 110-117, 2018.

LORENZI H.; NOBLICK L. R.; KAHN F.; FERREIRA E. **Flora Brasileira Lorenzi: Arecaceae (Palmeiras)**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. Nova Odessa, Brazil. 2010.

LOYOLA-VARGAS, V. M.; FUENTES, C.; MONFORTE-GONZALES, M.; MENDEZ ZEEL, M.; ROJAS, R.; MIJANGOS-CORTES, J. *Coffee* tissue culture as a new model for the study of somaclonal variation. In: **COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ**. 18. Helsinki. Proceedings... Paris: ASIC, p. 302-307, 1999.

MARTINOT, J.F.; PEREIRA, H. Dos S.; SILVA, S. C. P. Da. Coletar ou Cultivar: as escolhas dos produtores de açai-da-mata (*Euterpe precatoria*) do Amazonas. **Rev. Econ. Sociol. Rural**, Brasília, vol.55 n .4, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1234-56781806-94790550408>.

MARIE, D.; BROWN, S. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. **Biol Cell**, v.78, p.41-51, 1993.

MATTIA, R. C. **Embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de dendezeiro (*Elaeis guinensis* Jacq.)**.2009. Monografia (Ciências Biológicas – Setor de Ciências Biológicas). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Paraná, 2009.

MELO, E. F. **Embriogênese somática em cana-de-açúcar e aspectos morfoanatômicos**. 2011. 75 f. Tese (Doutorado em Fitotecnica), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

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.

MIRANDA, I.P.A.; RABELO, A.; BUENO, C.R.; BARBOSA, E. M.; RIBEIRO, M.N.S. **Amazon palm fruit**. MCT/INPA. Manaus, 2001.

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

MOHAMAD PUAD, N.I., ABDULLAH, T.A. (2018). Monitoring the Growth of Plant Cells in Suspension Culture. In: Amid, A., Sulaiman, S., Jimat, D., Azmin, N. (eds) Multifaceted Protocol in Biotechnology. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2257-0_17

MONTEIRO, T. R.; FREITAS, E.O.; NOGUEIRA, G.J.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Assessing the influence of subcultures and liquid medium during somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.), **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, 93:2, p. 196-203, 2017.

DOI: 10.1080/14620316.2017.1360156

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.

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

MUSTAFA NR, DE WINTER W, VAN IREN F, VERPOORTE R (2011) Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nat Protoc* 6:715–742

NAIK, P.M. AL-KHAYRI, L.M. Cell suspension culture as a means to produce polyphenols from date palm (*Phoenix dactylifera* L.) **Ciência e Agrotecnologia**, v. 42, n.5, p.464-473, 2018.

NODA, H. In situ breeding and conservation of Amazonian horticultural species. *In A. Borém, M. T. G. Lopes, C. R. Clement, and H. Noda [eds.], Domestication and breeding: Amazonian species*. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil. 2012, p. 170-208.

NOGUEIRA, O.L; CARVALHO, C.J.R. de; Muller, C.H; GALVÃO, E.U.P; SILVA, H.M; RODRIGUES, J.E.L.F; OLIVEIRA, M do S.P de; CARVALHO, J.E.U. de; ROCHA NETO, O.G. da; NASCIMENTO, W.M.O. do; CALZAVARA, B. B.G. **A Cultura do Açaí**. Brasília: EMBRAPA- SPI , 1995. 50p. (Coleção Plantar, 26).

NOGUEIRA, A. K. M.; SANTANA, A. C.; GARCIA, S.W. A dinâmica do mercado de açaí fruto do estado do Pará: de 1994 a 2009. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 60, n. 3, p. 324-33, 2013.

NOGUEIRA, S. R.; SILVA, I. M. da; MACEDO, P. E F. de; LUNZ, A. M. P.; ANDRADE NETO, R. de C. **Controle de Antracnose em Açaí-solteiro (*Euterpe precatoria*) no Acre**. Rio Branco, AC: Embrapa, 2017. 6 p. (Comunicado técnico, 197).

NOGUEIRA, O. L.; FIGUEIRÊDO, F. J. C.; MÜLLER, A. A. **Açaí**. Embrapa Amazônia Oriental, [s.l.], v. 4, p. 137, 2005.

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, M. do S. P. de. **Biologia floral do açaizeiro em Belém, PA**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2002. 26 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 8).

OLIVEIRA, M. do S. P. de. FERNANDES, G. L. da C.; Repetibilidade de caracteres do cacho de açazeiro nas condições de Belém, PA. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 613-616, 2001.

OLIVEIRA, M. do S. P. de; CARVALHO, J. E. U de; NASCIMENTO, W. M. O. do; MÜLLER, C. H. **Cultivo do açazeiro para produção de frutos**. Belém: Embrapa, 2002. 17p. (Circular técnica, 26).

OLIVEIRA, M.S.P.; MOCHIUTTI, S. NETO, J.T.F. 2009. Domesticação e melhoramento do Açazeiro. In: Borém A, Lopes MT, Clement CR. **Domesticação e Melhoramento – Espécies Amazônicas**. Viçosa: viçosa, pp. 207-235.

OLIVERIA, M.S.P.; FARIAS NETO, J. T. de.; MOCHIUTTI, S.; NASCIMENTO, W.M.O. do.; MATTIETTO, R. de. A. Açai-do-Pará. In: LOPES, R.; OLIVEIRA, M. do S. P. de; CAVALLARI, M. M.; BARBIERI, R. L.; CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S. da S.; **Palmeiras nativas do Brasil**. Belém, 2015. p.371-393.

OLIVEIRA, M.S.P.; NAVEGANTES, P.C.A.; COSTA, L.R. de J. **Obtenção de pólen e polinização controlada em espécies do gênero Euterpe**. EMBRAPA, DOCUMENTOS 450, ISSN 1983-0513, Belém/PA, 2019.

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações: meios de cultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, p. 74, 2001.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A; RAMOS, J.D. **Cultura de tecidos: tecnologia e aplicações**. Lavras: Ed. Brasil, 1997.

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.

PEARSE, A.G.E. **'Histochemistry: theoretical and applied. Vol.2'** 3^a ed. (The Williams & Wilkins Company: Baltimore). 1972.

PEIXOTO, H.; ROXO, M.; KRSTIN, S.; RÖHRIG, T.; RICHLING, E.; WINK, M. An anthocyanin-rich extract of acai (*Euterpe precatoria* Mart.) increases stress resistance and retards aging-related markers in *Caenorhabditis elegans*. **J Agric Food Chem**, v. 64, p. 1283–1290, 2016.

PÉPIN, M.; ARCHAMBAULT, J, CHAVARIE, C.; CORMIER, F. Growth kinetics of *Vitis vinifera* cell suspension cultures: I. Shake flask cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v.47, v.2, p.131-138, 1995. doi:10.1002/bit.260470203.

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 Cell.Dev. Biol. Plant**, Springer v. 42, p. 37–43, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1079/IVP2005722>.

PEREIRA, A. R.; CARVALHO, S. P.; PASQUAL, M.; SANTOS, F. C. Embriogênese somática direta em explantes foliares de *Coffea arabica* cv. Acaiá Cerrado: efeito de cinetina e ácido giberélico. **Ciência e Agroecologia**, v. 31, p. 332-336, 2007.

QUEIROZ, F.F., DE ARAÚJO SILVA-CARDOSO, I.M., SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. (2021). Initiation and Establishment of Cell Suspension Cultures in Bamboo. In: Ahmad, Z., Ding, Y., Shahzad, A. (eds) *Biotechnological Advances in Bamboo*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-1310-4_5

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 out 2020.

RAI, M. K.; SHEKHAWAT, N. S.; HARISH; 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.

RAMOS, F. S. L.; DEQUIGIOVANNI, G.; SEBBENN, A. M.; LOPES, M. T. G.; MACEDO, J. L. V. de; VEASEY, E. A.; ALVES-PEREIRA, A.; SILVA, P. P. da; GARCIA, J. N.; KAGEYAMA, P. Y. Paternity analysis, pollen flow, and spatial genetic structure of a natural population of *Euterpe precatoria* in the Brazilian Amazon. **Ecology and Evolution**, p.1-15, Oct. 2018.

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

RENCHE, A.C. **Methods of Multivariate Analysis**. A JOHN WILEY & SONS, INC. PUBLICATION. p.727. 2ed. 2002.

REINERT, J. Über die kontrolle der morphogenese und die induktion von adventivembryonene an gewebeulturen aus karotten. **Planta**, v. 53, p. 318 -333, 1958.

REY, H. Y.; MROGINSKI, L. A. Somatic embryogenesis and plant regeneration in diploid and triploide *Arachis pintoi*. **Biologia Plantarum**, v. 50, n. 1, p. 152-155, 2006.

REZENDE, J.C.; CARVALHO, C.H.S.; SANTOS, A.C.R.; PASQUAL, M. TEIXEIRA, J.B. Multiplication of embryogenic calli in *Coffea arabica* L. **Acta Scientiarum**, v. 34, n. 1, p. 93-98, Jan.-Mar., 2012.

ROCHA, E.; VIANA, V. M. Manejo de *Euterpe precatoria* Mart. (Açaí) no Seringal Caquetá, Acre, Brasil. **Scientia Forestalis**, n. 65, p. 59-69, 2004.

ROCHA, E. Potencial ecológico para o manejo de frutos de açazeiro (*Euterpe precatoria* Mart.) em áreas extrativistas no Acre, Brasil. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 34, n. 2, p. 237-250, 2004.

SALEH, E.O.L.; LUIS, Z.G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Determination of physiological and environmental conditions for the storage of babassu palm seeds (*Attalea speciosa*). **Seed Science and Technology**, v. 45, p. 139-150, 2017.

SANTANA, A.C.; COSTA, F.A. Mudanças recentes da oferta e demanda do açaí no estado do Pará. In: SANTANA, A.C., CARVALHO, D.F., MENDES, F.A.T. **Organização e competitividade das empresas de polpa de frutas do estado do Pará: 1995 a 2004**. UNAMA, 2010.

SANTOS, C. G. *et al.* Indução e análise bioquímica de calos em segmentos foliares e nodais de *Coffea canephora* L. cv. Apotã. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 20, n. 1, p. 22-29, jan./mar. 2008.

SATHLER MEIRA, FILIPE; GOMES LUIS, ZANDERLUCE; SILVA-CARDOSO, I. M. A.; EVERSON SCHERWINSKI-PEREIRA, JONNY. Developmental pathway of somatic embryogenesis from leaf tissues of macaw palm (*Acrocomia aculeata*) revealed by histological events. **FLORA**, v. 250, p. 59-67, 2019.

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

SEBRAE. **Boletim: produtos à base de açaí brasileiro**. Brasília, 2020. V 1. Disponível em: <
[http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/9f56e28eb2f2bb90496a1a44becc47ad/\\$File/5829.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/9f56e28eb2f2bb90496a1a44becc47ad/$File/5829.pdf)> Acesso em: 10 de setembro de 2020.

SILVA-CARDOSO, I. M. A. **Embriogênese somática de gueroba [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] com ênfase em aspectos anatômicos, histoquímicos e ultraestruturais**. 2018. 393 p. Tese (Doutorado em Ciências Florestais), Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

SILVA-CARDOSO, I.M.A.; MEIRA, F.S.; GOMES, A.C.M.M.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Anatomical and histochemical studies of the somatic embryogenesis of *Syagrus oleracea* from immature inflorescences. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 19, p. 444-450, 2019.

SILVA-CARDOSO, I.M.D.A., MEIRA, F.S. & SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. The maturity level of explant plays a key role in somatic embryogenesis of the palm tree *Syagrus oleracea* [Mart.] Becc.. **Acta Physiol Plant** 44, 87, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11738-022-03420-8>

SILVA, T. S.; CARVALHO FILHO, R. S. L.; TANAN, T. T.; ROCHA, T. C.; SANTANA, J. R. F. Calogênese em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 30, n. 3, p. 700-717, 2020.

SMITHA, P.D.; BINOY KR; & ASHALATHA, S.N. (2020) Enhanced Secondary Somatic Embryogenesis in Suspension Culture of Four Diploid Banana Cultivars from Kerala, International Journal of Fruit Science, 20:sup2, S617-S626, DOI: 10.1080/15538362.2020.1753138

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy**. The principles and practice of numerical classification. 1973, 573 p.

SONGSERM, P.; KLANRIT, P.; KLANRIT, P.; PHETCHARABURANIN, J.; THANONKEO, P.; APIRAKSAKORN, J.; PHOMPRAI, K.; KLANRIT, P. Antioxidant and Anticancer Potential of Bioactive Compounds from *Rhinacanthus nasutus* Cell Suspension Culture. *Plants* 2022, 11, 1994. <https://doi.org/10.3390/plants11151994>

SOSNOWSKA, J.; BALSLEV, H. American palm ethnomedicine: A meta-analysis. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, 5: 43-53, 2009.

SOUZA, M.O.; SANTOS, R.C.; SILVA, M.E.; PEDROSA, M.L. Açai (*Euterpe oleraceae* Martius): chemical composition and bioactivity Nutrire. **Revista Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, 36(2), p.161-169, 2011.

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.

STEIN, V.C.; PAIVA, P.; HERRERA, R.C.; VARGAS, D.P. Curva de crescimento e índice de divisão celular de calos de ingazeiro. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 53, n. 2, p. 159-163, 2010.

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, 2007.

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.

SWATI, J.; ALOK, V.; KOTHARY, S. L.; JAIN, S.; VARSHNEY, A. Cereal Res. **Commun**, v. 19, p. 230-231, 2001.

TAGORE, M. D. P. B. **O aumento da demanda do açaí e as alterações sociais, ambientais e econômicas: o caso das várzeas de Abaetetuba, Pará**. 155 p. - Universidade Federal do Pará, 2017.

TEIXEIRA, J.B.; JUNQUEIRA, C.S.; PEREIRA, A.J.P. da C.; MELLO, R.I.S. de; SILVA, A.P.D. da; MUNDIM, D.A. **Multiplicação clonal de café (*Coffea arabica* L) via embriogênese somática**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 39p. (Documentos).

THOMAS T.L. Gene expression during plant embryogenesis and germination: an overview. **Plant Cell**, v.5, p.1401-1410, 1993.

TOONEN, M.A.J.; VRIES, S.C.de. Initiation of somatic embryos from single cells. In: WANG, T.L.; CUMING A. (Eds), **Embryogenesis: the generation of a plant**. Oxford: Bios Scientific, 1996. p. 173-189.

TRIPATHI, M.K.; TRIPATHI, N.; TIWARI, S.; TIWARI, G.; MISHRA, N.; BELE, D.; PATEL, R.P.; SAPRE, S.; TIWARI, S. Optimization of Different Factors for Initiation of

Somatic Embryogenesis in Suspension Cultures in Sandalwood (*Santalum album* L.). **Horticulturae**, v. 7, n. 118, 2021. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7050118>

VÁZQUEZ, A. L. L. **Aprimoramento da obtenção de calos e suspensões celulares de *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae) e avaliação dos elicitores NaCl, KCl, AlCl₃, SNP(NO), ABA e luz UV na produção de metabólitos secundários.** 2019. 158f. Dissertação de Mestrado (Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2019.

VIDAL, B. C. Dichroism in collagen bundles stained with xyloidine-Ponceau 2R. **Annales d'Histochimie**, v. 15, p. 289-296, 1970.

VIEIRA, A. H.; RAMALHO, A. R.; ROSA NETO, C.; CARARO, D. C.; COSTA, J. N. M.; VIEIRA JUNIOR, J. R.; WADT, P. G. S.; SOUZA, V. F. **Cultivo do Açaizeiro (*Euterpe oleracea* Martius) no Noroeste do Brasil.** Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2018. (Embrapa Rondônia. Sistemas de produção 36). 90 p.

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.

WADT, L. H. de O.; RIGAMONTE-AZEVEDO, O. C.; FERREIRA, E. J. L.; CARTAXO, C. B da C. **Manejo de açaí solteiro (*Euterpe precatoria* Mart.) para produção de frutos.** Rio Branco, AC: Secretaria de Extrativismo e Produção Familiar, 2004. 34 p. 11. (Documento Técnico, 02).

WARCHOŁ M, SKRZYPEK E, KUSIBAB T, DUBERT F. Induction of somatic embryogenesis and biochemical characterization of *Cordyline australis* (G. Forst.) Endl. "Red Star" callus. **Sci Hortic (Amsterdam)** v. 192, p.338–345. doi: 10.1016/j.scienta.2015.05.010

WOO, HA.; KU, S.S.; JIE, E.Y.; KIM, H.; KIM, H.-S.; JEONG, W.-J.; PARK, S.U.; MIN, S.R.; KIM, S.W. Efficient plant regeneration from embryogenic cell suspension cultures of *Euonymus alatus*. **Sci Rep** 11, 15120 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94597-4>

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.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C. The determination of amino acids with ninhydrin. **Analyst**, v.80, p.209-213, 1955.

YOKOMIZO, G. K.-I. et al. Morphological dissimilarity among assai palm trees progenies from Anajás – PA. **European Scientific Journal**, Almería, v. 15, n. 21, 171-180, 2019.

YUYAMA, L. K. O.; AGUIAR, J. P. L.; SILVA FILHO, D. F. S.; YUYAMA, K.; VAREJÃO, M. de J.; FÁVARO, D. I. T.; VASCONCELOS, M. B. A.; PIMENTEL, S. A.; CARUSO, M. S. F. Caracterização físico-química do suco de açaí de *Euterpe precatoria* Mart. oriundo de diferentes ecossistemas amazônicos. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 41, n. 4, p. 545-552, 2011.

ZAVATTIERI, M. A.; FREDERICO, A. M.; LIMA, M.; SABINO, R.; ARNHOLDTSCHMITT, B. Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. **Electronic Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 13, n. 1, p.15, 2010.

ZENG, F.; ZHANG, X. ; ZHU, L.; TU, L.; GUO, X.; NIE, Y. Isolation and characterization of genes associated to cotton somatic embryogenesis by suppression subtractive hybridization and macroarray. **Plant Molecular Biology**, v.60, p.167–183, 2006.

ZIMMERMANN, M.J. Embriogênese somática. In: BARRUETO CID, L. P. **Cultivo in vitro de plantas** (3^a ed.) Brasília: EMBRAPA, 2014, 325p.

ZOUINE, J. e EL HADRAMI, I. Effect of 2,4-D, glutamine and BAP on embryogenic suspension culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.), **Science Horticulturae**, 2007.

CAPÍTULO II

ESTABELECIMENTO, MULTIPLICAÇÃO E ANÁLISE BIOQUÍMICA DE LINHAGENS EMBRIOGÊNICAS DE *Euterpe precatoria* Mart. SOB CULTIVO EM SUSPENSÃO

RESUMO

A palmeira *Euterpe precatória* (açai-solteiro) pertence à família Arecaceae. Essa espécie é considerada a palmeira de maior valor econômico do gênero *Euterpe* no Brasil. O palmito e o fruto são os principais produtos utilizados para industrialização devido propriedades energéticas. Essa espécie também possui grande importância social, cultura e ambiental. Assim, objetivou-se, neste estudo, estabelecer um protocolo de cultivo em suspensão celular de linhagens embriogênicas dessa espécie, a partir de diferentes fontes de explantes. Oito linhagens oriundas de diferentes explantes foram testadas, sendo cinco em meio líquido de MS (500 mg calos embriogênicos) suplementado com 5 μM Picloram e três em meio semissólido de MS (1,050 g de calo embriogênico) suplementado com 13,57 μM Picloram. A curva de crescimento foi obtida a partir da pesagem dos calos entre 60 e 180 dias de cultivo. O modelo Gompertz foi aplicado e a cinética de crescimento foi avaliada. Aos 100 dias de cultivo, verificou-se o teor de açúcares e proteínas solúveis totais. Os componentes principais (PCA) foram mensurados. O cultivo de linhagens de *E. precatória* em meio de consistência líquida foi realizado com sucesso e o estabelecimento foi obtido. As linhagens apresentaram diferenças estatísticas na curva de crescimento pelo teste Tukey a 5% de significância. Foi verificada a ausência da fase lag λ (dia). O modelo de Gompertz pode ser adequado, uma vez que descreve mais de 90% da cinética de crescimento das linhagens. A taxa máxima de crescimento específico das células varia entre as linhagens. No sistema líquido, as linhagens L6, L2 e L1 apresentaram o menor tempo para duplicar a biomassa. A análise multivariada revela elevado incremento de massas em culturas líquidas, representadas pelas linhagens L6 e L2. Diferenças estatísticas foram constatadas nos teores de AST, e os maiores níveis foram observados nas linhagens cultivadas em meio líquido. O teor de proteínas encontrado foi muito baixo, apresentando diferenças estatísticas entre as linhagens. A multiplicação apresenta comportamento significativo ao longo dos subcultivos, tanto entre linhagens quanto entre períodos de cultivo. O meio líquido configura-se como alternativa viável para a propagação *in vitro* de *Euterpe precatória*.

Palavras chaves: *Euterpe* spp.; meio líquido; meio de suspensão celular; açúcar solúveis totais; proteínas.

ABSTRACT

The palm *Euterpe precatoria* (açai-solteiro) belongs to the Arecaceae family. This species is considered the palm with the highest economic value within the *Euterpe* genus in Brazil. The heart of palm and the fruit are the main products used for industrialization due to their energetic properties. This species also holds great social, cultural, and environmental importance. Thus, the aim of this study was to establish a suspension cultivation protocol for the species using different explant sources. Eight lineages were tested, with five in liquid medium (500 mg embryogenic calli) MS supplemented with 5 μ M Picloram and three for comparison in semi-solid medium (1,050 g embryogenic calli) MS supplemented with 13.57 μ M Picloram. The growth curve was obtained by weighing the calli from 60 to 180 days of cultivation. The Gompertz model was applied, and growth kinetics were evaluated. At 100 days, the content of soluble sugars and total soluble proteins was determined. Principal components (PCA) were measured. The cultivation of *E. precatoria* lineages in liquid consistency medium was successfully carried out, and the establishment was achieved. The lineages showed statistical differences in the growth curve by Tukey test at a 5% significance level. The absence of the lag phase λ (day) was observed. The model can be considered adequate since the R² values found describe more than 90% of the growth kinetics of the lineages. In the liquid system, lineages L6, L2, and L1 showed the shortest time to double the biomass accumulation. Multivariate analysis reveals a significant increase in masses in liquid cultures, represented by lineages L6 and L2. There was statistical difference in the amount of TSS extracted, the highest TSS levels were observed in lineages cultivated in liquid medium. The protein content found was very low, showing statistical differences among the lineages. Liquid medium emerges as a viable alternative for vegetative propagation. Multiplication shows significant behavior over subcultures, both among lineages and among cultivation periods.

Keywords: *Euterpe* spp.; liquid medium; cell suspension medium; total soluble sugars; proteins.

1 INTRODUÇÃO

As palmeiras pertencem à família *Arecaceae*, uma das mais abundantes no mundo, com distribuição especialmente nos trópicos, podendo também ser encontradas em regiões subtropicais (BAKER et al., 2011). Algumas palmeiras possuem touceiras e outras um único estipe, como é o caso da espécie *Euterpe precatoria*, também conhecida como açai- solteiro (MELO et al., 2021; FERREIRA et al., 2020).

No ápice do estipe de *E. precatoria* localiza-se o palmito que é aproveitado na culinária brasileira e internacionalmente. Ele é usado como alimento há décadas e por muito tempo foi considerado o produto de maior valor econômico das espécies do gênero *Euterpe*, incluindo-se nesta lista o *E. edulis* e o *E. oleraceae* (OLIVEIRA et al., 2017; SANTOS et al., 2012). No entanto, atualmente, o produto de maior valor econômico das espécies de açazeiro, especialmente de *E. oleraceae* e *E. precatoria* é o fruto, devido as suas propriedades alimentares. De fato, os frutos contêm grandes quantidade de minerais como cálcio, magnésio, potássio e fósforo, além de serem ricos em vitaminas B1, C e E, tendo ainda, em sua composição, ácidos graxos essenciais, carotenoides, antocianinas e compostos fenólicos (GORDON et al., 2012; FERREIRA et al., 2016; LISBOA et al., 2022; OLIVEIRA et al., 2022).

Por essas e outras características, a demanda pelos frutos tem aumentado consideravelmente, o que torna necessário técnicas que favoreçam a melhoria da qualidade das mudas, principalmente no que se refere à produção mais rápida e, também, de variedades mais produtivas, resistentes a doenças e que promovam a uniformidade no sistema de produção. Adicionalmente, por ser uma espécie monocaule, ou seja, que não produz perfilhos, a espécie *E. precatoria* não apresenta condições de ser propagada vegetativamente por técnicas convencionais, fato que, além de impedir que indivíduos de interesse sejam clonados, em programas de seleção massal, limita consideravelmente a fixação de ganhos genéticos nos longos ciclos de seleção durante programas de melhoramento genético da cultura (RAMOS et al., 2021; FERREIRA et al., 2022b).

Assim, a micropropagação constitui uma ferramenta importante para superar boa parte desses problemas, por meio da clonagem via embriogênese somática (ES). Uma vez dominada, a clonagem via ES pode proporcionar a produção contínua de materiais propagativos, com a vantagem de poder ser realizada em qualquer época do ano e em pequeno espaço físico, a partir de pequena quantidade de materiais iniciais. Pesquisas realizadas utilizando a ES para a regeneração de plantas já foram realizadas em *E. precatoria* por Ferreira et al. (2022 a, b), que estabeleceram protocolos de embriogênese somática a partir de diferentes tipos de explantes (embrião zigótico e tecido foliar).

No entanto, a otimização de protocolos que tornem a técnica mais eficiente, reproduzível e capaz de gerar material em larga-escala é desafiador para as diversas espécies para a qual a técnica já foi desenvolvida, em especial, as pertencentes à família Arecaceae, que reconhecidamente é formada por espécies consideradas recalcitrantes ao cultivo *in vitro* (CARDOSO e SCHERWISKI-PEREIRA, 2018). Até o momento, não há registros do cultivo de *E. precatória* em sistemas líquidos de produção, ressaltando a necessidade de estudos adicionais para explorar o potencial dessa espécie. Cultivos em meio de consistência líquida já foram desenvolvidos, com certo sucesso, para algumas espécies de palmeiras, como *Elaeis guineenses* (MONTEIRO et al., 2018; KHAIRUDDIN et al., 2021) e *Phoenix dactylifera* (NAIK e AL-KHAYRI, 2016; 2018; ABOHATEM et al., 2017).

O uso de cultivos em meio líquido permite o estabelecimento de cultivos em suspensão, com conseqüente aumento da produção de materiais embriogênicos. Esse fato pode possibilitar que plantas clonadas sejam mais facilmente obtidas, além de favorecer a multiplicação e manutenção dos cultivos (SOH et al., 2011; GUILLOU et al., 2018; KONG et al., 2023). Nesse contexto, assim como a ES tem alcançado avanços significativos por intermédio de cultivos em suspensão em culturas, como acima mencionado, a presente pesquisa relata um protocolo confiável de cultivo de *E. precatória* em meio líquido, que pode configurar-se como um passo inicial para melhoria do processo de produção clonal de mudas dessa espécie. Adicionalmente, para entender a compreensão das mudanças bioquímicas e fisiológicas que ocorreram durante a multiplicação das linhagens embriogênicas obtidas, ineditamente também foram realizadas análises bioquímicas dessas linhagens, durante diferentes fases do processo.

Neste contexto, o estudo objetivou estabelecer cultivos em suspensão celular de *Euterpe precatória* a partir de calos oriundos de diferentes fontes de explantes, analisar a cinética do crescimento e multiplicação, além de avaliar anatomicamente e bioquimicamente os materiais sob essas condições de cultivo.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de desenvolvimento da pesquisa

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Cultura de Tecidos II, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, localizada em Brasília-Distrito Federal, Brasil.

Material vegetal, indução e multiplicação dos calos embriogênicos em meio semissólido

O material vegetal utilizado nos experimentos foi proveniente de indivíduos adultos de *Euterpe precatoria* coletados em floresta nativa no estado Acre, Brasil. Os calos originados de segmentos de inflorescência imatura, embrião zigótico e tecidos foliares foram induzidos e multiplicados de acordo com Ferreira (2020), Ferreira et al. (2022a) e Ferreira et al. (2022b), conforme é descrito a seguir:

a) Indução e multiplicação de calos oriundos de tecidos foliares

Calos oriundos de tecidos foliares foram induzidos a partir de explantes extraídos da região apical da palmeira (palmito), contendo folhas imaturas, ainda não expandidas e aclorofiladas. Para tanto, o meio básico de MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) foi suplementado com a auxina ácido 4-amino-3, 5, 6-tricloropicolínico (Picloram), em três concentrações (450, 675 e 900 μM), além de 30 g L^{-1} sacarose, 0,5 g L^{-1} de caseína hidrolisada, 0,5 g L^{-1} de cisteína, 0,5 g L^{-1} de glutamina, 2,3 g L^{-1} do agente gelificante *Phytigel* (Sigma, St. Louis, MO®) e 2,5 g L^{-1} de carvão ativado.

Após a indução dos calos primários, esses foram transferidos para novo meio semissólido de multiplicação, semelhante ao meio de MS descrito anteriormente, porém suplementado com 20 μM da auxina Picloram e 5 μM da citocinina de 2-isopenteniladenina (2iP) para multiplicação dos calos embriogênicos.

b) Indução e multiplicação de calos oriundos de inflorescências

Segmentos de inflorescências imaturas, provenientes de espatas ainda não abertas, foram inoculados em meio de cultura básico de MS, acrescido de 2,5 g L^{-1} de carvão ativado, suplementados com ferro EDTA e vitaminas na concentração original do meio de MS. A esse meio, foram adicionados ainda 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 e 450 μM de 2,4-D na e 45 μM de 2iP.

Após a indução dos calos primários, esses foram transferidos para meio semissólido de multiplicação, semelhante ao meio de MS descrito anteriormente, porém suplementado com 20 μM da auxina Picloram e 5 μM de 2iP para multiplicação dos calos embriogênicos.

c) Indução e multiplicação de calos oriundos de embriões zigóticos

Embrião zigótico, oriundos de frutos maduros, foram inoculados em meio contendo sais de Y3 (EEUWENS, 1976), acrescido de ferro EDTA e vitaminas na concentração original do meio de MS, 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 e 13,57 μM de Picloram.

Os calos obtidos na indução foram transferidos para de meio de multiplicação composto de sais de MS, 2,5 g L⁻¹ de carvão ativado, ferro EDTA e vitaminas na concentração original do meio de MS, 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. Esse meio foi suplementado ainda com 20 μM de Picloram e 5 μM de 2iP para multiplicação dos calos embriogênicos.

Para cada explante acima, antes da adição do agente gelificante e do carvão ativado nos meios, o pH foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ e, posteriormente, autoclavados à 121° C e 1,5 atm de pressão por 20 minutos. A indução e multiplicação de calos embriogênicos ocorreu em placas de Petri descartáveis (90 x 15 mm), contendo aproximadamente 25 mL de meio de MS ou Y3, conforme o tipo de explante, como especificado anteriormente, e seladas com filme PVC transparente (Lusafilm R105®, Brasil). Em todos os casos, os materiais foram cultivados em sala de crescimento, com ausência de luz e temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Os subcultivos foram realizados a cada 30 dias, por até 180 dias de cultivo em meio semissólido, verificando-se as porcentagens de estabelecimento, oxidação (escurecimento) e contaminação.

Pesagem dos materiais embriogênicos em meio semissólido

As linhagens embriogênicas friáveis, obtidas em meio semissólido, oriundas de tecidos foliares, inflorescências imaturas e de embriões zigóticos foram pesadas para avaliação do seu potencial de multiplicação. Cada linhagem avaliada foi composta por dez repetições, cada uma formada por uma placa de petri (15 x 90 mm).

Para avaliar a multiplicação dos calos embriogênicos, os calos foram pesados com massa inicial equivalente a 0,5 g em placas Petri, sempre taradas para pesagem regular em balança de precisão (Figura 1D). As pesagens dos materiais sob cultivo foram realizadas a cada 30 dias

para obtenção da curva de crescimento dos calos em meio semissólido, sendo a primeira realizada a partir dos 60 dias de inoculação e a última avaliação realizada aos 180 dias desde o início da multiplicação.

Estabelecimento de linhagens embriogênicas e multiplicação de agregados em suspensão

Os calos embriogênicos provenientes de folhas imaturas, segmentos de inflorescências imaturas e de embriões zigóticos, com consistência friável (fácil fragmentação), de coloração branca ou em tons claros de amarelo (Fig. 1E), foram fragmentados com auxílio de pinças e bisturi 11” sobre papel filtro acomodado no interior de placas de Petri (15 x 90 mm).

Uma vez pesadas, as linhagens embriogênicas com peso médio equivalente a 1,050 g foram inoculadas em frascos do tipo Erlenmeyers de 125 mL de capacidade (Fig 1B), preenchidos com 35 mL de meio de cultura líquido, formado pelos sais e vitaminas do meio de MS, além de 5 μM de Picloram, 30 g L^{-1} de sacarose, 0,5 g L^{-1} de glutamina, 0,1 g L^{-1} de asparagina e 0,1 g L^{-1} de caseína hidrolisada. Após a inoculação, os frascos foram tampados com papel alumínio (Thermopratt) e lacrados usando filme PVC transparente. Após 24 h em repouso, os Erlenmeyers contendo os materiais propagativos foram colocados em agitador orbital a 100 rpm, com fotoperíodo de 16 horas, em sala de crescimento a 25 ± 2 °C, sob lâmpadas fluorescentes brancas-frias e radiação luminosa de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os subcultivos foram realizados a cada 30 dias, por até 180 dias, verificando-se a porcentagem de estabelecimento (sobrevivência dos materiais). Para a obtenção da curva de crescimento, as pesagens foram realizadas a cada 30 dias, a partir dos 60 dias de inoculação.

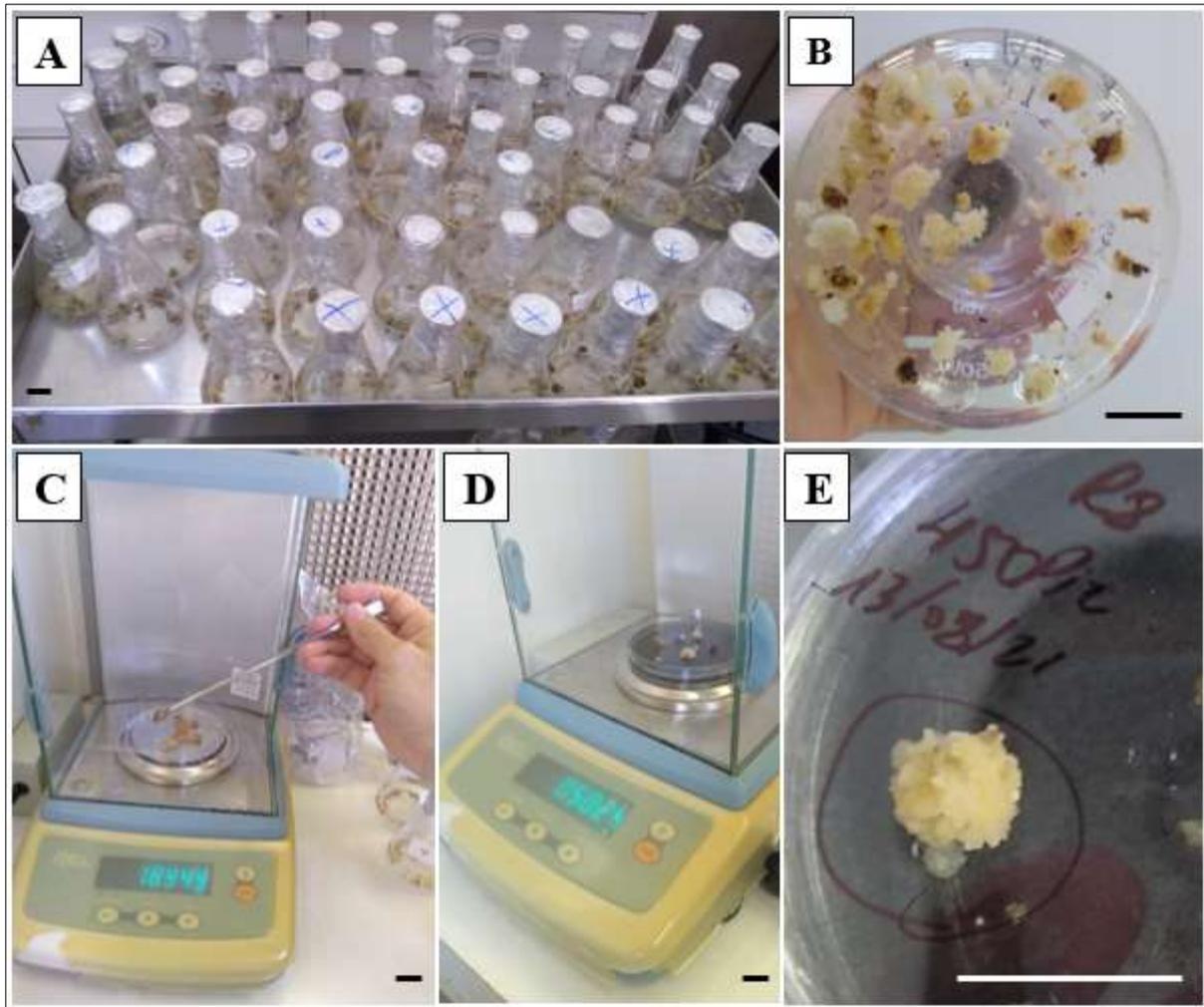


Figura 1. Aspectos dos calos friáveis embriogênicos de *Euterpe precatoria* inoculados em meio líquido. **A.** Linhagens inoculadas em meio líquido sob agitação; **B.** Calo friável utilizado para o estabelecimento de cultivos em suspensão em meio líquido; **C.** Pesagem dos calos cultivados em meio líquido; **D.** Pesagem dos calos cultivados em meio semissólido; **E.** Aspecto morfológico dos calos embriogênicos, com consistência friável e coloração variando entre amarelo e bege, inoculados em meio semissólido.

Caracterização das linhagens

De maneira geral, avaliaram-se cinco tipos de materiais propagativos, todos oriundos de material somático de plantas adultas, denominados de linhagens embriogênicas. Três dessas linhagens foram obtidas de explantes foliares (L450, L675 e L900), denominadas conforme a concentração de auxina (450, 675 e 900 μM de Picloram) utilizada na fase de indução de calos e o meio de cultivo. Sendo assim, L1, L2 e L3 denominaram as linhagens cultivadas em meio líquido oriundas de calos obtidos de folhas imaturas de plantas adultas induzidas em meio semissólido, nas concentrações de 450, 675 e 900 μM de Picloram, respectivamente. Já as linhagens L5 e L6 foram induzidas em meio semissólido a partir de inflorescências e embriões zigóticos, respectivamente, e posteriormente cultivadas em meio líquido. Consideraram-se

como linhagem L4, L7 e L8 materiais propagativos provenientes de folhas imaturas, inflorescências e embriões zigóticos, respectivamente, induzidas e cultivadas em meio semissólido.

Delineamento e análise estatística da pesagem dos calos cultivados em meio semissólido x meio líquido

Adotou-se delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 2 x 6 (cinco linhagens embriogênicas x dois sistemas de cultivo x seis períodos de cultivo), totalizando 60 tratamentos. Cada tratamento foi formado por dez repetições (dez frascos). O conjunto de dados obtido foi submetido à análise de regressão linear, e, quando significativa, as médias foram comparadas pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, por meio do software estatístico SISVAR (FERREIRA, 2020).

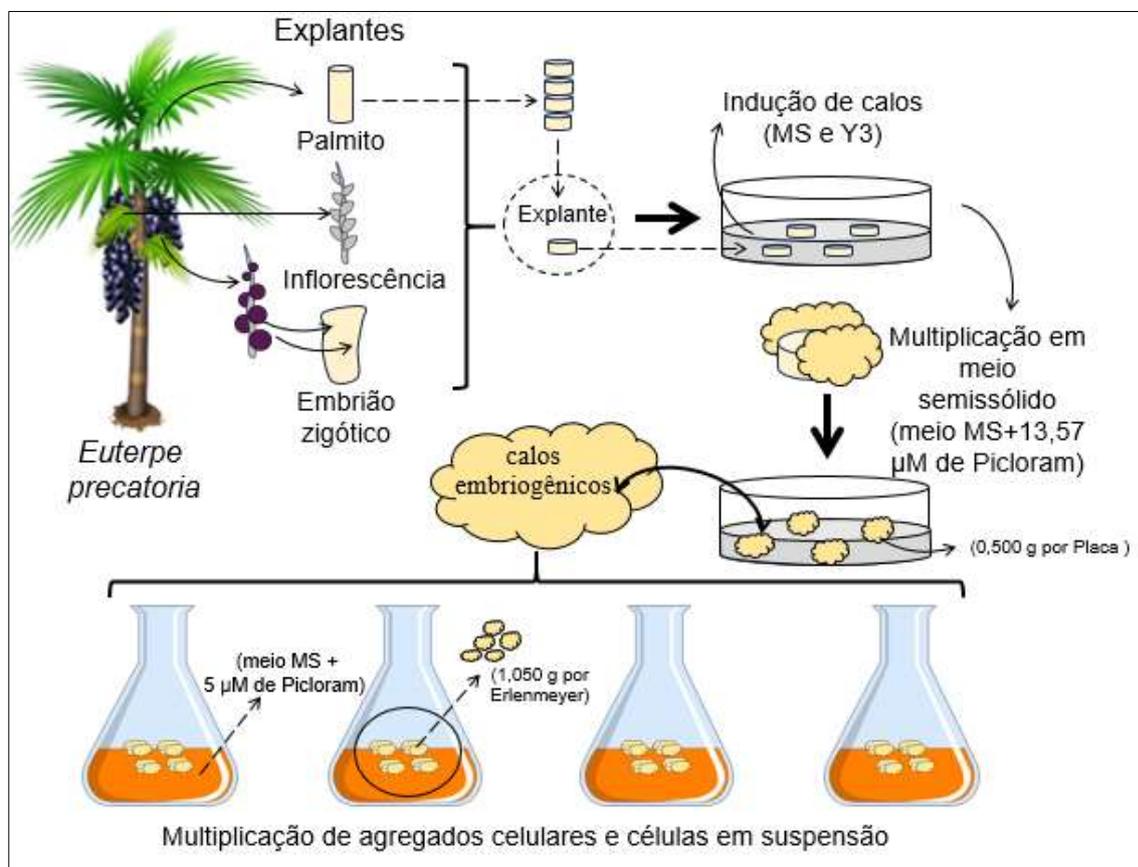


Figura 2. Esquema ilustrativo da calogênese para o estabelecimento e multiplicação de agregados celulares em suspensão e em meio semissólido.

Modelagem de Gompertz

A modelagem foi realizada aplicando análise de regressão não linear pelo modelo matemático de Gompertz, usando o software GraphPad Prism 9.0.

$$Y = a * e^{(-be^{-c*t})} \quad (1)$$

Em que: Y = variável dependente (g); t = tempo de cultivo (dias); “ a ”, “ b ” e “ c ” = constantes de integração;

A partir das constantes, foram estimados os parâmetros cinéticos de crescimento das suspensões.

Parâmetros cinéticos

μ_{max} = velocidade máxima de crescimento específico das células (d^{-1}), calculada conforme a fórmula abaixo:

$$\mu_{max} = a * c \quad (2)$$

λ = tempo da fase lag;

$$\lambda = \frac{b - 1}{c} \quad (3)$$

G = o tempo para geração ou duplicação das células:

$$G = \frac{\ln(2)}{\mu_{max}} \quad (4)$$

Análise dos Componentes Principais (PCA)

A aplicação da estatística multivariada, por meio da análise dos componentes principais (PCA), teve por objetivo permitir o agrupamento ou não de linhagens quanto às semelhanças de desenvolvimento. Para tanto, utilizaram-se os softwares GraphPad Prism 9.0 e R versão 4.2.1. O uso de cada software ocorreu conforme a necessidade específica de cada análise. Para essa etapa, usou-se o pacote “FactorMiner”.

A partir dos dados obtidos, também foi gerado uma matriz de correlação de Pearson entre todos os tratamentos, por meio 999 permutações. A matriz foi gerada utilizando o software GraphPad Prism 9.

Caracterização bioquímica

Para análise bioquímica das linhagens embriogênicas de *E. precatória*, foram realizadas a extração e quantificação das proteínas solúveis totais (PST) e açúcares solúveis totais (AST)

presentes nos calos embriogênicos multiplicados em meio líquido e semissólido (Figura 3), conforme metodologia adaptada de Gomes et al. (2014), aos 100 dias de cultivo.

Açúcares Solúveis Totais (AST)

Para a determinação dos açúcares solúveis totais (AST), as amostras foram lavadas três vezes em água ultrapura para remover resíduos de meios de cultura, congeladas instantaneamente em nitrogênio líquido e liofilizadas por 72 h. A extração dos açúcares foi realizada conforme metodologia adaptada de Gomes et al. (2014). Foram inoculados 10 mg das amostras secas em microtubos de 2 mL, submetidos à quatro ciclos extração em 0,5 mL de metanol a 80% (v/v), a 80°C em banho-maria por 20 minutos. Em cada extração, as amostras foram agitadas em vórtex e, em seguida, foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos. Os sobrenadantes foram coletados e adicionados em novos microtubos até atingirem 2 mL de volume. Os *pellets* resultantes nos primeiros microtubos foram armazenados em ultrafreezer, a -80 °C, para utilizações futuras.

Em seguida, as amostras foram postas para secar em *speed vac* à 40°C e o produto seco foi ressuspensão em 500 µL de água ultrapura, seguindo o protocolo de Dubois (1956). Prepararam-se duplicatas de cada amostra para quantificação de açúcares solúveis totais. Assim, em tubos de ensaio (25 x 150 mm) foram pipetadas 50 µL das amostras dos sobrenadantes, mais 450 µL de água ultrapura, seguido de 500 µL de Fenol 5 % (v/v) e 2.500 µL de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄).

Os tubos permaneceram em repouso até entrarem em equilíbrio com a temperatura ambiente (15 minutos aproximadamente). Então foi realizada a leitura das absorbâncias das amostras em cubetas de vidro em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800) com comprimento de onda de 490 nm. Todas as leituras foram realizadas com base na curva padrão de glicose (1 mg/1 mL), com concentrações crescentes de 0, 8, 16, 32, 64, 128 e 258 µg.

O conjunto de dados obtido foi submetido à Análise Variância (ANOVA) e, quando significativa, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, por meio do software estatístico SISVAR (FERREIRA, 2020).

Proteínas totais (PST)

Para extração das proteínas solúveis totais (PST), utilizou-se protocolo adaptado de Gomes et al. (2014). Assim, 300 mg de amostra fresca dos materiais vegetais foram maceradas em nitrogênio líquido, em cadinho de porcelana, previamente congelado. Posteriormente, foram

adicionados 3 mL de tampão fosfato de potássio (100 mM e pH 7,5). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, durante 20 minutos a 4°C e, os sobrenadantes, recolhidos e acondicionados em novos microtubos. Após o procedimento de extração, prosseguiu-se para a quantificação das PST, segundo método de Bradford. Assim, 5 µL das amostras foram pipetados em microplacas de 96 poços (Elisa) e, logo após, foram adicionadas 250 µL de solução Bradford 50% por cinco minutos em repouso. Passado esse período, as absorbâncias das amostras foram verificadas em espectrofotômetro a 595 nm. As análises foram efetuadas em tríplice, baseadas na curva padrão de albumina de soro bovina (BSA), com dosagens progressivas de 20, 40, 60, 80 e 100 µg mL⁻¹.

O conjunto de dados obtido foi submetido à Análise Variância (ANOVA) que, quando significativa, tiveram as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, por meio do software estatístico SISVAR (FERREIRA, 2020).

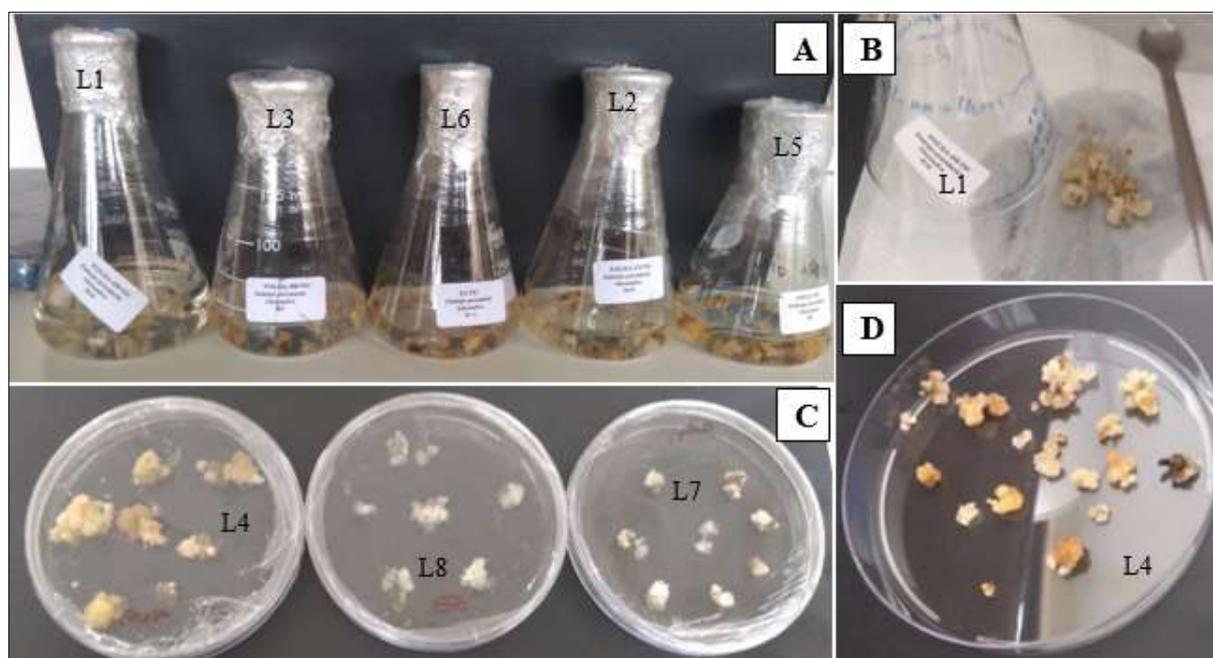


Figura 3. Calos e linhagens embriogênicas utilizadas na caracterização bioquímica cultivados em meio líquido e semissólido de *Euterpe precatoria* Mart. **A.** Linhagens em meio líquido aos 100 dias de cultivo (L1, L3, L6, L2 e L5, respectivamente). **B e D.** Aspecto do material inoculado em meio líquido. **C.** Linhagens em meio semissólido aos 100 dias de cultivo (L4, L7 e L8, respectivamente).

RESULTADOS

Estabelecimento inicial de calos em meio líquido e multiplicação de agregados e células em suspensão

O cultivo de linhagens de *E. precatória* em meio de consistência líquida foi realizado com sucesso e o estabelecimento foi obtido. Aos 30 dias de cultivo, consideraram-se estabelecidas todas as linhagens embriogênicas inoculadas, uma vez que, nesse período, o crescimento foi aparente (Figura 4).

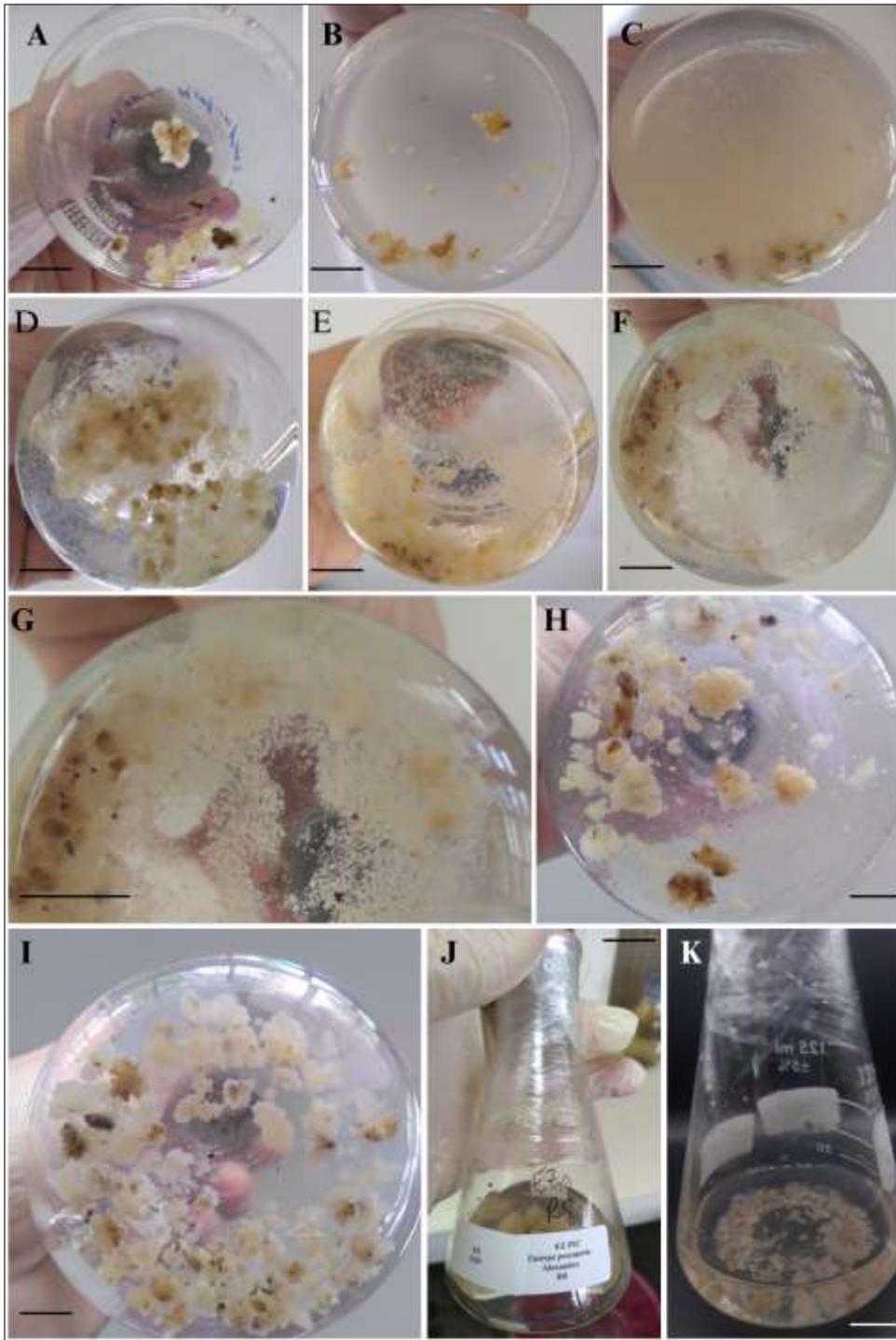


Figura 4. Desenvolvimento de agregados celulares a partir de diferentes linhagens embriogênicas de *Euterpe precatoria* Mart. (açai-solteiro) em diferentes tempos de cultivo em meio líquido. **A.** Aspectos morfológicos dos calos no dia da inoculação (tempo zero na linhagem L1). **B-C.** Presença de células em suspensão aos 45 dias (B = L1 e C = L2); **D-G.** presença de micro calos e aumento da biomassa (L2); **H.** Detalhe dos micro calos aos 60 dias oriundos de tecidos foliares (L2); **H.** Calos de material somático oriundo de embrião zigótico aos 90 dias (L6); **I.** Calos de material somático oriundo de embriões zigóticos aos 180 dias (L6). **J-K.** Representação de uma das repetições e repicagem dos calos oriundo de embriões zigóticos (L6).

As linhagens apresentaram 100% de sobrevivência e com níveis irrisórios de oxidação ao longo do experimento. Aos 45 dias, nas linhagens inoculadas em meio líquido surgiram as primeiras estruturas, caracterizadas como novos agregados celulares.

O crescimento é caracterizado pela formação de materiais friáveis, tanto pela presença de células isoladas quanto pela presença de micro calos. Nos frascos das linhagens L1 e L2, essas estruturas eram mais evidentes, embora também tenham surgido em frascos das linhagens L3 e L6. Esse comportamento abre novas perspectivas, pavimentando não somente o uso de suspensões celulares para a produção massal de plantas de açai-solteiro via embriogênese somática, mas também para a produção de metabólitos secundários na espécie. Assim, se registra pela primeira vez agregados celulares em suspensão para uma espécie do gênero *Euterpe*. As colorações mais presentes foram de calos brancos e em tons de bege, que permaneceram por todo período do experimento (Figura 4).

O desenvolvimento de novas estruturas entre as linhagens cultivadas em meio líquido foi ainda mais notável aos 60 dias de cultivo (Figura 5). Com base nas mensurações de peso entre o cultivo em meio líquido e semissólido, pôde-se verificar que os resultados encontrados foram satisfatórios para o incremento de massa entre as linhagens cultivadas em meio líquido, uma vez que apresentaram incremento de massa semelhante ou superior quando comparadas às linhagens cultivadas em meio semissólido, sobretudo nas linhagens origem foliar e de embrião zigótico.

A superioridade na multiplicação proporcionada pelo cultivo em meio líquido pode ser observada também para linhagens provenientes de folhas imaturas de *E. precatoria*, cultivadas em meio líquido (L1, L2 e L3), que demonstraram comportamento semelhante ou superior quanto ao incremento de massa quando comparadas com a linhagem L4, que foi cultivada em meio semissólido (Figura 5).

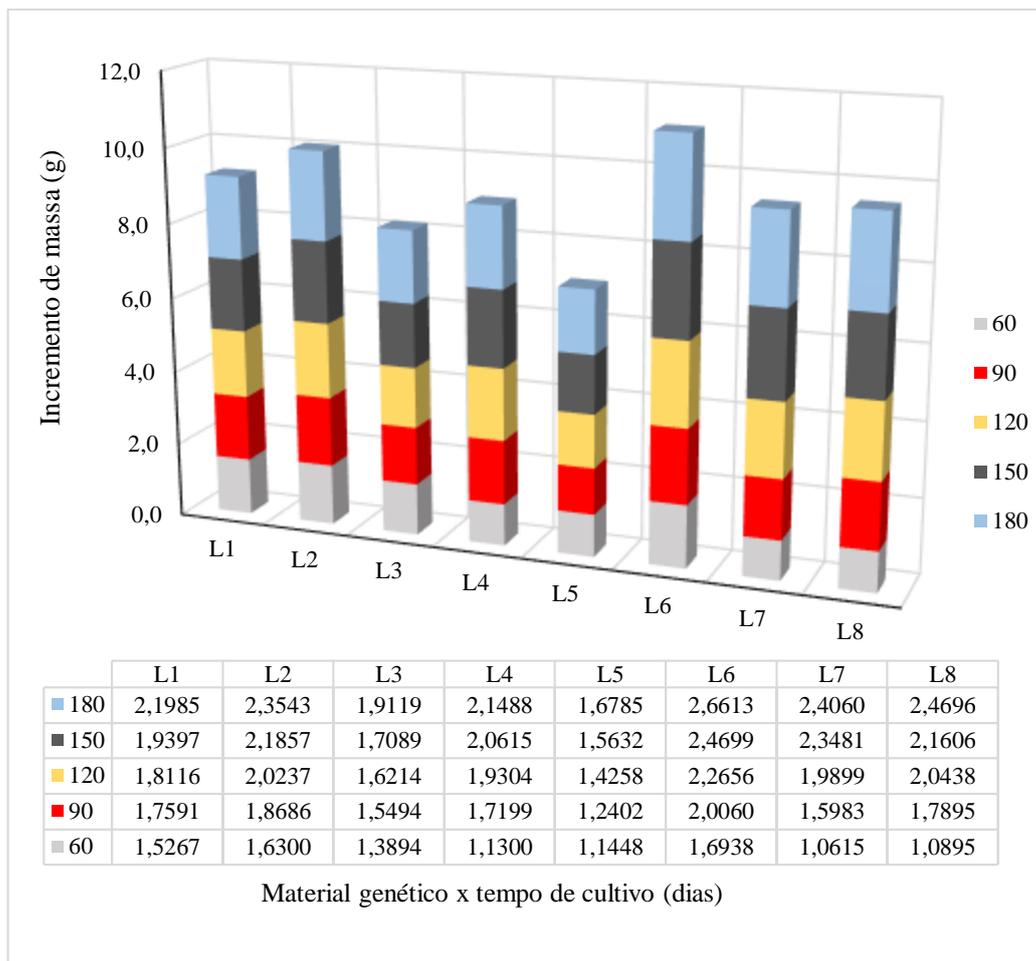


Figura 5. Médias do crescimento de agregados celulares de *E. precatória* Mart. em meio de suspensão celular e em meio semissólido, em função da linhagem celular. L1, L2 e L3 - linhagens cultivadas em meio líquido obtidas de calos provenientes de folhas imaturas de plantas adultas cultivadas em meio semissólido (450, 675 e 900 μ M de Picloram, respectivamente). L5 e L6 - linhagens de materiais cultivados em meio líquido, induzidas em meio semissólido a partir de inflorescências e embriões zigóticos, respectivamente. L4, L7 e L8 - materiais propagativos originados de folhas imaturas, inflorescências e embriões zigóticos, respectivamente, induzidos e cultivados em meio semissólido.

Verifica-se, entre as linhagens de folhas imaturas tanto em meio líquido quanto no meio sólido, que a linhagem L2 apresentou os maiores incrementos de massa em todos os tempos de cultivo. Essas linhagens superaram o incremento de massa do tratamento L4 do meio semissólido, sendo constatadas diferenças estatísticas na análise do desdobramento de médias dentro de cada nível de tempo. Esses dados estão presentes na Tabela 1.

Entre as linhagens provenientes de material vegetal de inflorescências imaturas (L5 - meio líquido e L7 - semissólido), verificou-se melhor comportamento no incremento de massa quando cultivadas em meio semissólido, destacando diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância. Para tanto, no meio líquido, a linhagem desse

material genético vegetal apresentou os menores incremento de massa do experimento (Tabela 1).

Tabela 1. Desdobramento das médias de incremento de massa (g) de agregados celulares de *E. precatoria* Mart. cultivadas em meio de suspensão celular e em meio semissólido, em função da linhagem celular em cada tempo de cultivo, pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Linhagem m Celular	Incremento de massa fresca (g) em cada período de cultivo (dias)				
	60	90	120	150	180
L1	1,52 AB c	1,75 AB bc	1,811 BCD abc	1,93 CDE ab	2,19 BC a
L2	1,63 A c	1,86 AB bc	2,02 AB abc	2,18 ABC ab	2,35 AB a
L3	1,38 ABC bc	1,54 BC ab	1,62 CD ab	1,70 DE ab	1,91 BD a
L4	1,13 BC c	1,71 AB b	1,93 ABC ab	2,06 BCD ab	2,14 BC a
L5	1,14 BC cd	1,24 C bcd	1,42 D abc	1,56 E ab	1,67 D a
L6	1,69 A c	2,00 A bc	2,26A ab	2,46 A a	2,66 A a
L7	1,06 C d	1,59 BC c	1,98 ABC bc	2,34 AB ab	2,40 AB a
L8	1,08 C c	1,78 AB b	2,04 AB b	2,16 ABC ab	2,46 AB a

Nota: Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre material genético (linhagem) dentro de cada nível de tempo. Letras minúsculas diferentes indicam diferença na análise do desdobramento de tempo dentro de cada nível de material genético (linhagem) pelo teste Tukey, 5% de significância. L1, L2 e L3 linhagens cultivadas em meio líquido obtidas linhagens de folhas imaturas induzidas em meio semissólido nas concentrações de auxina a 450, 675 e 900 µM de Picloram, respectivamente. L5 e L6 linhagens de materiais cultivados em meio líquido, induzidas em meio semissólido a partir de inflorescências e embriões zigóticos, respectivamente. L4, L7 e L8 materiais propagativos oriundos de folhas imaturas, inflorescências e embriões zigóticos, respectivamente, induzidos e cultivados em meio semissólido.

Já os cultivos provenientes de embrião zigótico (L6) apresentaram os melhores resultados de incremento de massa no meio líquido (Tabela 1, Figura 5). Ainda que o cultivo de embrião zigótico no meio líquido tenha sido superior quando comparado ao meio semissólido (L4), esses foram semelhantes estatisticamente pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância.

O estabelecimento e multiplicação de linhagens de inflorescências imaturas em meio líquido (L5) é considerado outro resultado importante, considerado superior à L7 – oriunda desse mesmo tipo de explante cultivado previamente em meio semissólido (L7). Esses resultados se aprimorados, pode-se obter resultados ainda mais promissores para estas e outras culturas. Ainda com base na Tabela 1 acima, para cada período, há alterações no comportamento das linhagens ao longo do experimento, sendo encontradas diferenças significativas em todos os períodos analisados. Aos 60 dias, todas as linhagens de materiais somáticos foliares (L1, L2 e L3) e de embriões zigóticos (L6), cultivadas em meio líquido, apresentaram o incremento médio de massa fresca significativamente superior comparados as demais linhagens durante a multiplicação.

Aos 90 dias, as linhagens estatisticamente superiores foram L6, L2, L8, L1 e L4 com, respectivamente, 2,00 g, 1,86 g, 1,78g, 1,75g e 1,71g de incremento de massa fresca. Entretanto, das cinco linhagens mencionadas, três são cultivadas em meio líquido (L6, L2 e L1) e duas do meio semissólido (L8 e L4). Assim, duas das cinco primeiras mencionadas acima foram cultivadas em meio líquido, sendo superiores ganho de massa, embora semelhantes estatisticamente.

A partir dos 120 dias até o final do experimento (180 dias), quatro linhagens se diferenciam estaticamente das demais, sendo duas cultivadas em meio líquido (L6 e L2) e duas em meio semissólido (L7 e L8). A linhagem L7 obteve destaque entre linhagens cultivadas no meio semissólido. Para tanto, chama-se atenção novamente para o fato de linhagens cultivadas em meio líquido estarem entre as linhagens estatisticamente superiores nos períodos mencionados. Assim, os resultados apontam que o sistema de cultivo líquido pode ser utilizado para multiplicação de materiais genéticos de *E. precatória*.

Outro resultado importante pode ser evidenciado pela análise de regressão, que também foi possível verificar o crescimento significativo em incremento de massa (g) das linhagens em função dos períodos de cultivo. O comportamento linear de cada linhagem é apresentado na Figura 6.

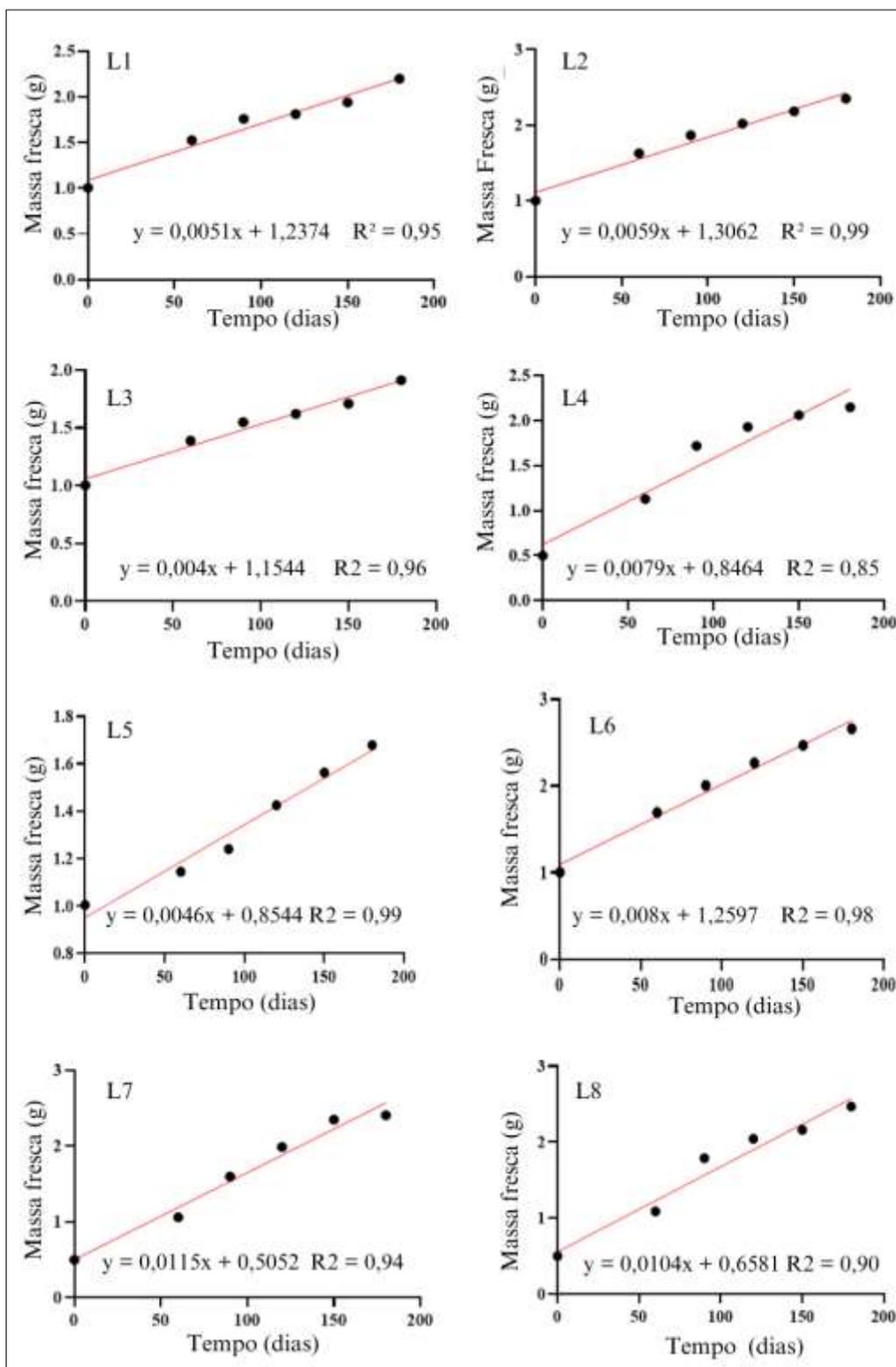


Figura 6. Análise de regressão linear de agregados celulares de *Euterpe precatoria* Mart. cultivados em meio de suspensão celular e em meio semissólido, em função da linhagem celular.

Nota: L1, L2 e L3 linhagens cultivadas em meio líquido obtidas linhagens de folhas imaturas de plantas adultas induzidas em meio semissólido nas concentrações de auxina a 450, 675 e 900 μM de Picloram, respectivamente. L5 e L6 linhagens de materiais cultivados em meio líquido, induzidas em meio semissólido a partir de inflorescências e embriões zigóticos,

respectivamente. L4, L7 e L8 materiais propagativos originados de folhas imaturas, inflorescências e embriões zigóticos, respectivamente, induzidas e cultivadas em meio semissólido.

Na análise linear, verifica-se que os pontos correspondentes as massas obtidas no experimento estão sob ou bem próximas à reta traçada em todas as linhagens. Esse resultado indica que os desvios foram muito baixos em relação à linha de regressão ajustada. Os coeficientes de correlações encontrados variam de 0,85 a 0,99, e demonstram a relação consistente e bem definida entre o peso e o tempo de crescimento. Assim, a correlação é positiva direta, ou seja, com o aumento do período de cultivo ocorre o incremento da produção de biomassa de agregados celulares de açaí solteiro, evidenciando um ajuste forte entre o tempo de crescimento e o incremento de massa observado.

Cinética de crescimento de calos e agregados celulares e aplicação de modelo matemático de Gompertz

A aplicação do modelo matemático permite uma visão mais característica de crescimento dos células e agregados celulares nos seus respectivos meios de cultivo. Assim, aplicou-se o modelo de Gompertz para obtenção da curva e da cinética de crescimento utilizando as constantes estimadas na equação (Figura 8).

De maneira geral, pode-se observar que os dados não apresentaram um desvio grande da curva obtida e que os pontos correspondentes as massas obtidas no experimento também estão sob ou bem próximas à reta traçada em todas as linhagens. Os coeficientes de correlações encontrados variam de 0,97 a 0,99 e demonstram a relação consistente e bem definida entre o peso e o tempo de crescimento.

As linhagens genéticas cultivadas no sistema semissólido foram inoculadas inicialmente com 0,5 g de material genético, duas vezes menor que o utilizado nas linhagens inoculadas no sistema líquido (1,050 g). Esse fato constitui uma das explicações para o resultado das curvas mais acentuadas para o sistema semissólido (Figura 7).

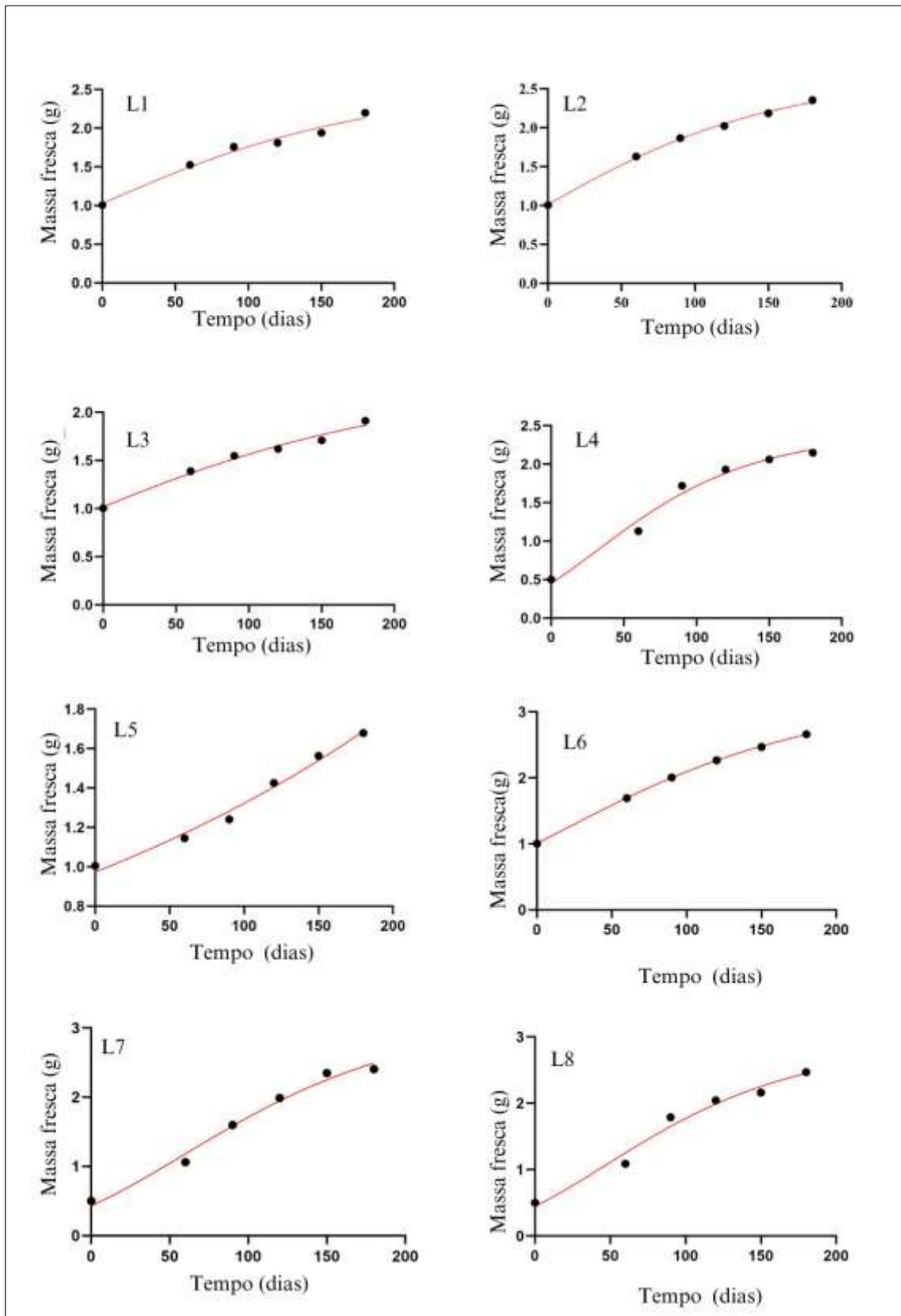


Figura 7: Curvas de crescimento dos calos de *Euterpe Precatoria* (açai-solteiro) ajustadas ao modelo de Gompertz ($Y = a * e^{(-be^{-c*t})}$).

Nota: L1, L2 e L3 linhagens cultivadas em meio líquido obtidas linhagens de folhas imaturas de plantas adultas induzidas em meio semissólido nas concentrações de auxina a 450, 675 e 900 μM de Picloram, respectivamente. L5 e L6 linhagens de materiais cultivados em meio líquido, induzidas em meio semissólido a partir de material somáticos de inflorescências e embrião zigótico, respectivamente. L4, L7 e L8 materiais propagativos originários de material somático de plantas adultas obtidas de folhas imaturas, inflorescências e embrião zigótico, respectivamente, induzidas e cultivadas em meio semissólido.

Analisando as curvas, percebe-se que a fase lag foi imperceptível no crescimento de todas as linhagens analisadas. O que indica que todas as linhagens adentraram diretamente na fase de crescimento exponencial. Nos cultivos em meio semissólido, na linhagem L4, por exemplo, essa fase predominou aproximadamente até os 60 dias, sendo sucedida pela fase linear, embora essa linhagem tenha apresentado um padrão sigmoide mais perceptível que as demais linhagens. Nas linhagens L7 e L8, as fases de crescimento exponencial foram mais curtas e muito parecidas, e duraram aproximadamente 70 dias de cultivo, sendo sucedida pela fase linear, que durou até o final do experimento.

Nos cultivos em meio líquido, as linhagens L1, L2 e L6 tiveram uma fase de crescimento exponencial que durou aproximadamente 90 dias de cultivo, sendo sucedida pela fase linear. A linhagem L3, apresentou fase de crescimento exponencial um pouco mais prolongada, que durou aproximadamente 110 dias de cultivo, sendo sucedida pela fase linear, que durou menor tempo quando comparadas às linhagens L1 e L2.

Na linhagem L5, a uma fase de crescimento exponencial durou aproximadamente 120 dias de cultivo, sendo sucedida pela fase linear. A fase linear destacou-se em todas as linhagens pela maior predominância de tempo, caracterizando o comportamento crescente na maior parte do tempo de cultivo. Esse comportamento é demonstrado pelo ajustamento das curvas que evidencia o crescimento celular contínuo. Isso proporcionou outro evento em comum entre as linhagens, a ausência da fase de senescência. Essa fase não é observada em nenhuma das linhagens.

Embora as linhagens tenham apresentado esse tipo de comportamento, o modelo pode ser considerado adequado, uma vez que os valores de R^2 encontrados descrevem mais de 90% da cinética de crescimento das linhagens (Tabela 2).

Tabela 2. Constantes do modelo de Gompertz ($Y = a * e^{(-be^{-c*t})}$) das suspensões de *Euterpe precatoria* Mart. (açai-solteiro) cultivadas em meio líquido e em meio semissólido, em função da linhagem celular em cada tempo de cultivo.

s	Parâmetro	Linhagens genéticas							
		L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8
	a	2,552	2,672	2,328	2,405	2,04	3,235	3,18	2,911
	b	-0,09	0,031000	-0,1899	0,51238	0,00821	0,1559	0,69143	0,626376
	c	0,00902	0,01084	0,00732	0,01599	0,01965	0,0098	0,01169	0,01326
	R ² (%)	0,97	0,99	0,98	0,98	0,99	0,99	0,98	0,97

Nota: L1, L2 e L3 linhagens cultivadas em meio líquido obtidas linhagens de material somático de folhas imaturas de plantas adultas induzidas em meio semissólido nas concentrações de auxina a 450, 675 e 900 µM de Picloram, respectivamente. L5 e L6 linhagens de materiais cultivados em meio líquido, induzidas em meio semissólido a partir de material somáticos de inflorescências e embrião zigótico, respectivamente. L4, L7 e L8 materiais propagativos originários de material somático de plantas adultas obtidas de folhas imaturas, inflorescências e embrião zigótico, respectivamente, induzidas e cultivadas em meio semissólido.

Por meio das constantes encontradas no modelo de Gompertz, obteve-se os resultados dos parâmetros cinéticos. Nos resultados, pode-se observar que os dados da duração da fase lag λ (dia) de crescimento são negativos. Assim, confirma-se o observado nos gráficos nas curvas das linhagens, a ausência da fase lag λ (dia) (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros cinéticos das suspensões de *Euterpe precatoria* Mart. (açai-solteiro) cultivadas em meio líquido e em meio semissólido, em função da linhagem celular em cada tempo de cultivo; μ_{max} = velocidade máxima de crescimento específico das células (d⁻¹); λ = tempo da fase lag e G = tempo de geração (dia).

s	Parâmetro	Linhagens genéticas							
		L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8
	μ_{max} (d ⁻¹)	0,0229	0,0289	0,0169	0,0383	0,0102	0,0319	0,0371	0,0388
	λ (dia)	120,878	95,0695	162,516	30,5	180,72	85,4472	26,4019	28,1818
	G (dia)	30,1	23,9	40,8	18,0	53,6	21,7	18,6	17,9

Nota: L1, L2 e L3 linhagens cultivadas em meio líquido obtidas linhagens de material somático de folhas imaturas de plantas adultas induzidas em meio semissólido nas concentrações de auxina a 450, 675 e 900 µM de Picloram, respectivamente. L5 e L6 linhagens de materiais cultivados em meio líquido, induzidas em meio semissólido a partir de material somáticos de inflorescências e embrião zigótico, respectivamente. L4, L7 e L8 materiais propagativos originários de material somático de plantas adultas obtidas de folhas imaturas, inflorescências e embrião zigótico, respectivamente, induzidas e cultivadas em meio semissólido.

Os resultados demonstraram variações significativas entre as linhagens genéticas em termos de crescimento e metabolismo. Verifica-se que o tempo de geração das células foi menor

entre as linhagens cultivadas no sistema semissólido (L8, L4 e L7). A taxa máxima específica de crescimento (μ_{max}) observado foi de $\pm 0,0388d^{-1}$, para Linhagem L8, com um tempo de geração (G) de 17,9 dias até que as culturas atingissem seu pico de duplicação. A linhagem L4 e L7 apresentam μ_{max} de $\pm 0,0383$ e $\pm 0,0371 d^{-1}$, levando em média aproximadamente 18 e 18,6 dias, respectivamente, para que as culturas alcançassem seu pico de duplicação de biomassa.

Entre as linhagens cultivadas no sistema líquido, as linhagens L6, L2 e L1 apresentaram um tempo médio de 21,7, 23,9 e 30,1 dias para duplicar o acúmulo de biomassa, a uma taxa máxima específica de crescimento (μ_{max}) em média de $\pm 0,0319$ e $\pm 0,0289$ e $\pm 0,0229 d^{-1}$. As linhagens com menores valores foram L3 e L5, tanto para taxa máxima específica de crescimento (μ_{max}) quanto para tempo de geração (G) d^{-1} .

Análise dos Componentes Principais (PCA)

Os dois componentes principais explicaram 84,08% da variação total dos dados, sendo, portanto, o PCA bem ajustado, que permitiu observar a tendência no desenvolvimento dos calos em suspensão. PC1 representou 68,62% da relação, com separação das linhagens em *clusters*. Correlações positivas entre as linhagens cultivadas em meio semissólido formaram um agrupamento, foram plotados nos dois quadrantes do lado direito. Outros parâmetros influenciaram no crescimento e separaram as linhagens cultivadas em meio líquido, porém também foram plotados nos dois quadrantes do lado direito (Figura 8).

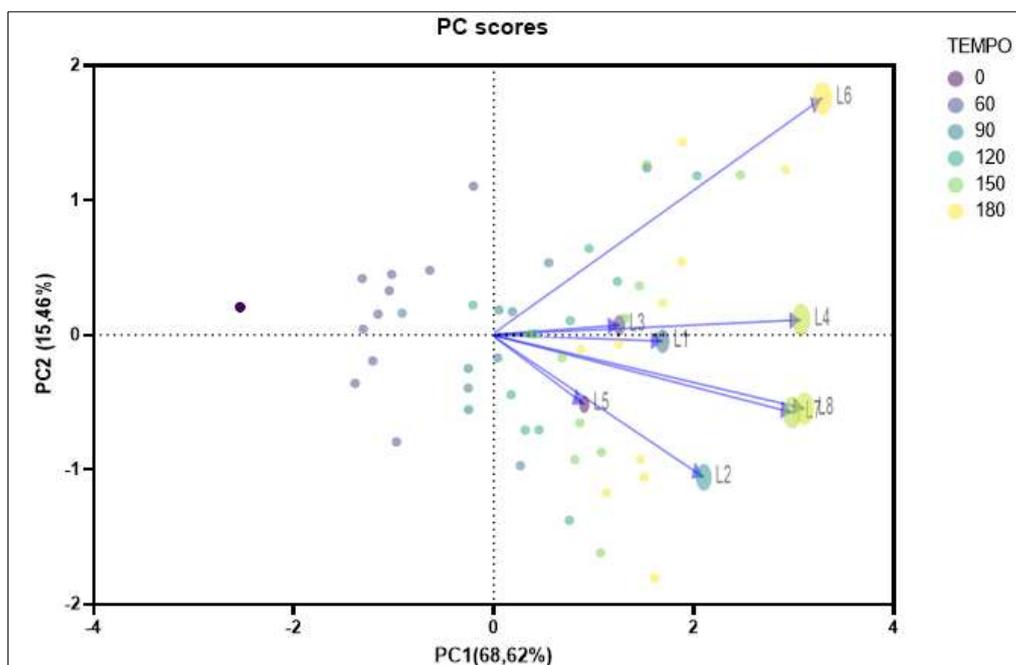


Figura 8. Biplot PC1 × PC2 sobre as variáveis de incremento de biomassa ao longo do tempo de cultivo em linhagens de *Euterpe precatoria* Mart. (açai solteiro) cultivadas em meio líquido e semissólido. R= (84,08%). Nota: L1, L2 e L3 linhagens cultivadas em meio líquido obtidas linhagens de folhas imaturas de plantas adultas induzidas em meio semissólido nas concentrações de auxina a 450, 675 e 900 µM de Picloram, respectivamente. L5 e L6 linhagens de materiais cultivados em meio líquido, induzidas em meio semissólido a partir de inflorescências e embriões zigóticos, respectivamente. L4, L7 e L8 materiais propagativos originados de folhas imaturas, inflorescências e embriões zigóticos, respectivamente, induzidas e cultivadas em meio semissólido.

A linhagem L6 (EZ) obteve maior vetor quando comparado com as demais linhagens, indicando um comportamento distinto quanto ao cultivo *in vitro* em meio de suspensão. O posicionamento do vetor com angulações maiores e isolado indica que as correlações com as demais linhagens não foram fortes, embora os resultados evidenciem uma proporção bastante consistente da linhagem. Assim, a análise dos componentes principais comparados (Figura 8) com os resultados de incremento de biomassa (Figura 5) evidenciam o destaque desta linhagem para cultivo em suspensão.

A análise dos componentes principais também evidencia outro comportamento que apresenta destaque quanto ao cultivo *in vitro* em meio de suspensão, referente à linhagem L2. Para essa linhagem, esse fato também é constatado pelo posicionamento mais isolado do vetor quando comparado com as demais linhagens provenientes de folhas imaturas cultivadas em meio de suspensão. A posição do vetor da linhagem L2 evidencia uma angulação mais afastada das L1 e L3, resultado que exprime a diferença no ganho de incremento de biomassa entre a L2 e as L1 e L3.

As linhagens L1 e L3 possuem crescimento similares para o PCA1, uma vez que apresentam vetores de comprimento mais próximos entre si e ao eixo PCA1, e, portanto, apresentam uma forte interação. Além disso, essas linhagens apresentaram uma correlação positiva mais forte com as linhagens L7 e L8, sendo essas linhagens (L1 e L3) separadas das outras.

Com relação as linhagens cultivadas em meio semissólido, verifica-se a alta correlação positiva entre L7 (INFLO) e L8 (EZ). Aqui também se verifica que além dos comprimentos serem muito parecidos, esses também estão muito próximos entre si e as angulações são muito agudas. Os vetores estão com angulações equidistantes às linhagens L7e L8. Assim, o agrupamento das amostras apresenta comportamentos de crescimento semelhantes entre as linhagens cultivadas em sistema semissólido. Outra linhagem semelhante foi a L4.

A análise de componentes principais demonstrou haver diferentes estágios de crescimento entre as linhagens. Assim, para obter mais informações do comportamento entre as linhagens,

verificou-se o quão essas são similares por meio da matriz de crescimento de Pearson, pelas correlações (Tabela 4).

Tabela 4. Matriz de correlações de Pearson sobre as variáveis de incremento de biomassa ao longo do tempo de cultivo em linhagens de *Euterpe precatoria* Mart. (açai solteiro) cultivadas em meio líquido e semissólido.

	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8
L1	1							
L2	0,442538	1						
L3	0,806086	0,304885	1					
L4	0,688598	0,481738	0,70229	1				
L5	0,367706	0,616863	0,507675	0,567687	1			
L6	0,569232	0,319139	0,588079	0,6351	0,17377	1		
L7	0,793988	0,661721	0,769715	0,685457	0,682535	0,545888	1	
L8	0,847541	0,69538	0,757587	0,824372	0,668518	0,56254	0,9259	1

Nota: L1, L2 e L3 linhagens cultivadas em meio líquido obtidas linhagens de material somático de folhas imaturas de plantas adultas induzidas em meio semissólido nas concentrações de auxina a 450, 675 e 900 μ M de Picloram, respectivamente. L5 e L6 linhagens de materiais cultivados em meio líquido, induzidas em meio semissólido a partir de material somáticos de inflorescências e embrião zigótico, respectivamente. L4, L7 e L8 materiais propagativos originado de material somático de plantas adultas obtidas de folhas imaturas, inflorescências e embrião zigótico, respectivamente, induzidas e cultivadas em meio semissólido.

Como verificado na análise dos componentes principais, as linhagens L7 e L8 têm uma correlação mais forte entre si, com um coeficiente de correlação de 0,92. Em outras palavras, quando uma aumenta, a outra tende a aumentar também, e vice-versa, em uma proporção bastante consistente, sendo essa correlação positiva. Essa forte correlação sugere que as linhagens L7 e L8 podem estar relacionadas de alguma forma ou podem ser influenciadas por fatores semelhantes no conjunto de dados.

Surpreendentemente, as linhagens L1 e L8 têm a correlação bastante forte entre si, com um valor de 0,84, indicando uma correlação positiva bastante consistente. O valor das correlações de (L1, L3) é 0,80, o que indica também uma correlação positiva forte entre as linhagens L1 e L3. As linhagens L3 e L7 também têm uma correlação bastante forte (0,76). A linhagem L5 tem correlação moderada com as variáveis L2 (0,61) e L7 (0,68).

Assim, com base nos resultados das correlações observadas, há linhagens que apresentam associações genéticas mais fortes entre si. Podem-se identificar os padrões nas relações entre as linhagens estudadas, sendo os agrupamentos mais fortes dentro do seu respectivo sistema de cultivo. Para tanto, dentro de cada sistema houve também padrões e associações diferentes. Esses resultados evidenciam a significância dos efeitos do sistema de cultivo em relação ao

incremento de massa (g) das linhagens dentro cada tempo. Assim, o meio em que cada linhagem é cultivada promove interação entre as linhagens e o tempo de cultivo.



Figura 9. Aspectos morfológicos das melhores linhagens de calos embriogênicos de *Euterpe precatoria* cultivadas em meio líquido ao final do experimento. **A, B e C.** Calos pertencentes à linhagem L2 oriundos de folhas imaturas induzidas em meio com 675 μM de Picloram. **D- F.** Calos pertencentes à linhagem L1 oriundos de folhas imaturas induzidas em meio com 450 μM de Picloram. **G-I.** Calos pertencentes à linhagem L6 oriundos de embriões zigóticos induzidos em meio Y3.

Caracterização bioquímica - teores Açúcares Solúveis Totais (AST) e Proteínas Solúveis Totais (PST) de *E. precatoria*

Houve diferença estatística na quantidade de AST extraídos das linhagens (Figura 10). A quantidade de AST extraído foi muito expressiva. Os maiores teores de AST foram observados nas linhagens cultivadas em meio líquido.

As linhagens cultivadas em meio líquido apresentaram resultados de AST acima dos 500 $\mu\text{g mg}^{-1}$ de matéria seca, fato não ocorrido nas linhagens cultivadas em meio semissólido. Os AST nas linhagens cultivadas em meio líquido variaram entre 517,41 e 700 $\mu\text{g mg}^{-1}$ de massa seca de AST, sendo mais elevado nas linhagens de folhas imaturas (L1, L3 e L2), respectivamente, constatando-se ainda diferenças significativas entre elas, conforme observado na figura abaixo (Figura 10).

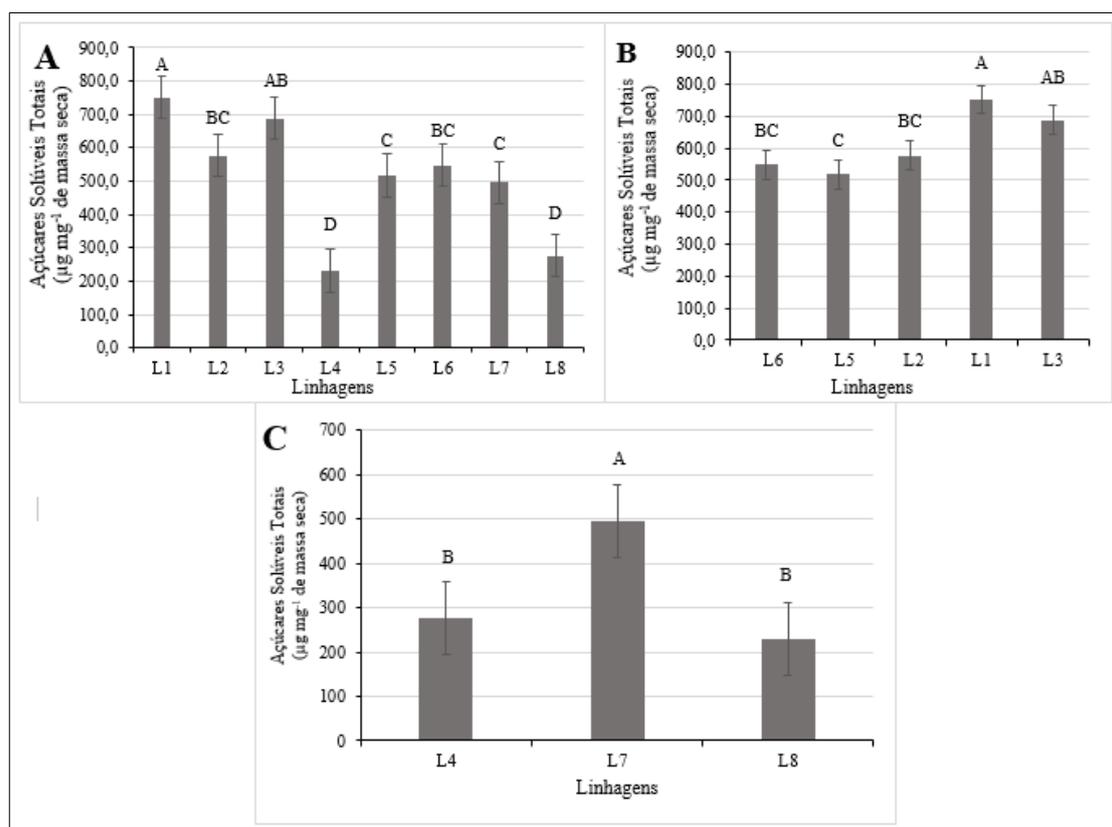


Figura 10. Açúcares Solúveis Totais (AST) de culturas de calos e agregados em suspensão e em meio semissólido em linhagens genéticas de *Euterpe precatoria* (açáí solteiro), aos 100 dias de cultivo. Médias seguidas de mesma letra indicam semelhança entre as linhagens pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade. Barras representam erro padrão. A = comparação entre todas as linhagens. B = Comparação das linhagens cultivadas em meio líquido. C = Comparação entre as linhagens em meio semissólido. Nota: L1, L2, e L3 representam linhagens provenientes de material somático de folhas imaturas, inflorescências imaturas e embrião zigótico respectivamente, em meio líquido; L5 representam linhagens genéticas provenientes de material somático de inflorescências imaturas em meio líquido. L6 representam linhagens genéticas provenientes de material somático de embrião zigótico em meio líquido. L4, L7 e L8 representam linhagens provenientes de material somático de folhas imaturas, inflorescências imaturas e embrião zigótico respectivamente, em meio sólido.

A linhagem com maior teor de AST foi a L1 (Figura 10). Essa linhagem apresentou uma quantidade muito elevada de açúcares, sendo superior a $700 \mu\text{g mg}^{-1}$ de massa seca. Semelhante a essa linhagem, menciona-se a L3, que apresentou uma quantidade muito elevada de AST ($688,05 \mu\text{g mg}^{-1}$).

As linhagens L2 e L6 apresentaram semelhança estatística com a linhagem L3, sendo que a L2 apresentou $576,57 \mu\text{g mg}^{-1}$ de massa seca de AST e a linhagem L6 apresentou $547,58 \mu\text{g mg}^{-1}$ de massa seca de AST.

Embora tenha crescimento pouco expressivo em meio líquido quando comparada com demais linhagens, ainda assim, a linhagem L5 apresentou conteúdo elevado de AST, $517,41 \mu\text{g mg}^{-1}$ de massa seca, ainda que o conteúdo de açúcares tenha sido inferior estatisticamente aos das demais linhagens cultivadas em meio líquido. Para tanto, com um comportamento semelhante estatisticamente a essa, foi a linhagem L7 - $495,87 \mu\text{g mg}^{-1}$ de massa seca de AST. Essa linhagem apresentou o maior teor de AST entre as linhagens cultivadas em meio semissólido (Figura 10).

Essas duas linhagens embora tenham sido cultivadas em sistemas diferentes, são provenientes de inflorescências imaturas de *E. precatoria*, sendo seu comportamento quanto às reservas bioquímicas de açúcares e proteínas muito parecidos entre os dois sistemas de cultivo. Assim, verifica-se como um padrão existente nas reservas de AST e PST.

Padrões parecidos também foi verificado nas linhagens embriogênicas de folhas imaturas (L1, L2 e L3), isto é, níveis semelhantes de AST, apresentaram níveis equivalentes de PST. Quando as linhagens foram semelhantes em uma variável, o mesmo comportamento foi observado na outra variável bioquímica (Figura 10 e 11).

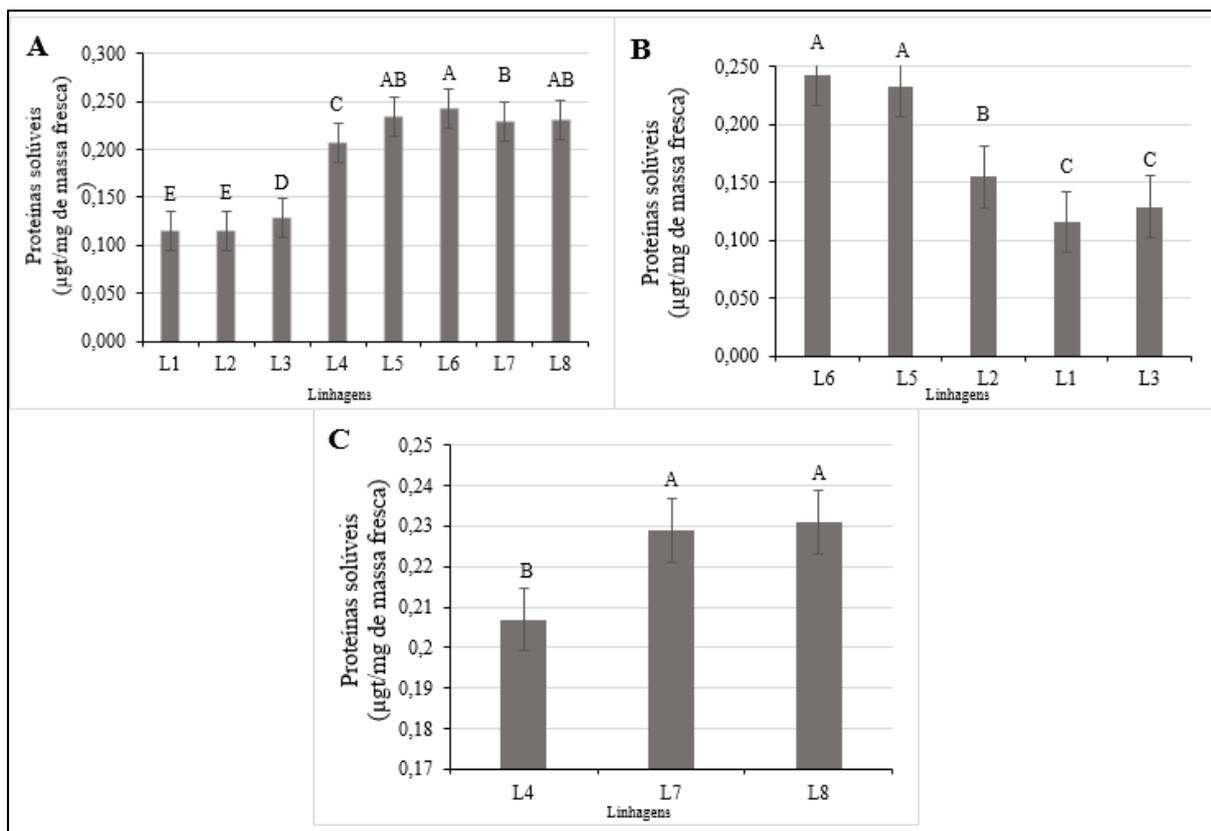


Figura 10. Proteínas Solúveis Totais (PST) de culturas de calos e agregados em suspensão e em meio semissólido em linhagens genéticas de *Euterpe precatoria* (açai solteiro), aos 100 dias de cultivo. Médias seguidas de mesma letra indicam semelhança entre as linhagens pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade. Barras representam erro padrão. A = comparação entre todas as linhagens. B = Comparação das linhagens cultivadas em meio líquido. C = Comparação entre as linhagens em meio semissólido.

Nota: L1, L2, e L3 representam linhagens provenientes de material somático de folhas imaturas, inflorescências imaturas e embrião zigótico respectivamente, em meio líquido; L5 representam linhagens genéticas provenientes de material somático de inflorescências imaturas em meio líquido. L6 representam linhagens genéticas provenientes de material somático de embrião zigótico em meio líquido. L4, L7 e L8 representam linhagens provenientes de material somático de folhas imaturas, inflorescências imaturas e embrião zigótico respectivamente, em meio sólido.

Os resultados das análises bioquímicas evidenciam as duas linhagens com maiores quantidades de reservas proteicas, L6 (0,243 µg de Prot/mg MF) e L5 (0,233 µg de Prot/mg MF), ambas cultivadas em meio líquido. As linhagens L8 foi estatisticamente semelhante às linhagens acima descritas, uma vez que os níveis de reservas foram muito próximos dessas linhagens (0,231 µg de Prot/mg MF). A linhagem L7 foi semelhante estatisticamente à linhagem L8.

DISCUSSÃO

Estabelecimento inicial de calos em meio líquido e multiplicação de células e agregados em suspensão

Usando linhagens de calos embriogênicos, obtidas de diferentes tipos de explantes (folhas imaturas, inflorescências imaturas e embriões zigóticos), o cultivo em suspensão foi alcançado. A linhagem proveniente de embriões zigóticos (L6) obteve o maior incremento de massa (g) em relação aos demais explantes. Entre as linhagens oriundas de explantes foliares, a linhagem L2 obteve o maior incremento de massa.

O tipo de calo foi fundamental para o sucesso do estabelecimento. O calo friável branco ou levemente amarelado (Figuras 1-4) (com alta friabilidade = alta facilidade de fragmentação) foi estabelecido no meio líquido. Salienta-se que esse tipo de calo é essencial para o estabelecimento de culturas em suspensão celular. Em meio líquido sob agitação, as células se dispersam e se desenvolvem sinergicamente (MUSTAFA et al., 2011; BHATIA, 2015; LING et al., 2015).

O estabelecimento de linhagens em meio líquido possibilita o aprimoramento biotecnológico das pesquisas desenvolvidas com *E. precatoria*. Isso permite ainda a abertura para outros estudos, como por exemplo, pesquisas relacionadas à produção de metabólitos secundários (JAMIL et al., 2018; HUA et al., 2019; SONGSERM et al., 2022) e potencializa a multiplicação de propágulos embriogênicos e a taxa de conversão embrião somático-planta (AL-KHARI 2012; GUILLOU et al., 2018; JIE et al. 2019; QUEIROZ et al., 2021; WOO et al., 2021).

Apesar da sua importância, o uso de meio líquido para multiplicação e regeneração *in vitro* em palmeiras ainda se encontra a passos lentos (Kong et al., 2023), apesar do empenho de estudiosos rumo à protocolos eficientes de propagação de palmeiras via ES usando meio o líquido, tais como *Cocos nucifera* L. Kong et al. (2023), *Phoenix dactylifera* L. por Abohatem e Maazis (2021), *Elaeis guineensis* Jacq. por Panggabean et al. (2023), *Euterpe edulis* por Mello et al. (2023), para posteriormente alcançarem a regeneração eficiente de plantas.

Assim, este estudo constitui o primeiro relato em *E. precatoria*. Estes resultados também implicam em um importante achado para o aprimoramento do programa de melhoramento genético da espécie e melhor entendimento no cultivo *in vitro* do açaí- solteiro. É importante salientar que as linhagens cultivadas em meio semissólido também obtiveram eficiência na multiplicação dos calos, sobretudo as L7 e L8. Essa eficiência pode estar relacionada à quantidade inicial de calos inoculados no meio semissólido.

Embora o estabelecimento e multiplicação de linhagens em meio líquido tenham sido eficientes, é necessário estabelecer uma quantidade ótima de material inicial a ser inoculado. Ramchandra et al. (2020), analisando a indução de calos para o estabelecimento da cultura de suspensão celular de cominho (*Cuminum cyminum* L.), verificaram o número ótimo de células para estabelecer uma cultura de suspensão celular bem desenvolvida, caso contrário, a divisão celular pode não ocorrer.

Além da quantidade, deve-se levar em consideração o tamanho do agregado, uma vez que este também pode influenciar nos resultados (RAMCHANDRA et al., 2020). Contudo, o tamanho dos agregados em suspensão pode variar de espécie para espécie e das condições gerais de cultivo (MONTEIRO et al., 2018).

O entendimento desses mecanismos é crucial para otimizar a produção de biomassa e compostos de interesse em aplicações de biotecnologia vegetal. Como por exemplo, a quantidade de meio líquido. As linhagens foram inoculadas em 35 ml de meio líquido. A quantidade de meio pode limitar o crescimento das culturas em suspensão e favorecer a ocorrência de hiperidricidade (AMINE MAZRI; MEZIANI, 2015).

Outro fator importante a ser considerado deve-se ao fato das linhagens cultivadas em meio semissólido serem mantidas no escuro, e não se tem informações sobre o desenvolvimento de cultivos em meio líquido no escuro para a espécie. Estudos futuros podem esclarecer o comportamento dessas linhagens quanto à luminosidade ideal para multiplicação de propágulos.

A luz pode inibir o surgimento de metabólitos secundários e compostos fenólicos essenciais para o crescimento celular. Arias et al. (2016) verificaram que a luz inibiu o acúmulo de alguns metabólitos secundários e compostos fenólicos em culturas em suspensão celular de *Thevetia peruviana*. Nos cultivos em suspensão, os metabólitos secundários, incluindo os compostos fenólicos influenciam a regulação do crescimento celular e na proteção contra estresses ambientais (GUTIÉRREZ-GAMBOA et al., 2020). Estudos feitos por Beigmohamadi et al. (2019) observaram os efeitos da luz e da escuridão na cultura de suspensão celular em *Plumbago europaea*. Esses autores verificaram que a presença de luz afetou o crescimento celular.

O crescimento das linhagens em meio líquido não foi afetado pela leve oxidação. Além disso, sua ocorrência não comprometeu o potencial embriogênico das culturas. Compostos específicos liberados pelas culturas no meio de suspensão podem atuar evitando a oxidação na reação em cadeia (TRUNJARUEN et al., 2023).

Ao avaliar a Tabela 1, com os resultados da Figura 6, referentes à multiplicação das linhagens L1, L2 e L3 (material de folhas imaturas) em meio de suspensão sobre a influência do tempo (dias) no incremento de massa (g), verifica-se que a partir dos 90 dias as linhagens apresentaram diferenças estatísticas entre si, sendo L2 e L1 superiores.

Assim, aos 90 dias, para fins de multiplicação, recomenda-se qualquer uma das linhagens referidas acima para proliferação de estruturas embriogênicas. Adicionalmente, sugere-se não ultrapassar os 90 dias de cultivo em suspensão para transferência das células e agregados celulares para a etapa de meio semissólido, pois ao analisar os gráficos de regressão, verifica-se que o incremento de massa entre 90 e 120 dias são quase imperceptíveis, embora tenham sido identificadas diferenças significativas entre esses tempos (Tabela 1).

Já para a linhagem L6, a curva de regressão (Figura 6) evidencia uma distância maior entre 90 e 120 dias. Contudo, também se recomenda 90 dias para prosseguimento das etapas posteriores da ES. A linhagem L5 obteve um nível muito baixo de multiplicação, sendo mais eficaz no meio semissólido. Para tanto, a cultura foi estabelecida e novos testes podem ser desenvolvidos para aprimoramento do cultivo em suspensão.

As Figuras 4 e 9 revelaram resultados surpreendentes da multiplicação em meio líquido. Esse fato está ligado ao surgimento e desenvolvimento notável das estruturas isoladas nos frascos, evidenciando assim que as linhagens adquiriram competência para formação de novas estruturas. Pequenos fragmentos se desenvolveram de formas distintas ao longo dos subcultivos, sendo visivelmente observados.

Gompertz e cinética do crescimento

As linhagens inoculadas em meio semissólido apresentaram padrão sigmoide mais perceptível. A quantidade inicial de material inoculado favoreceu o leve padrão sigmoide. O período de coleta de dados pode ter exercido influência na curva de crescimento, e no resultado do tempo da fase lag, visto que a primeira mensuração realizada somente aos 60 dias de cultivo e, portanto, o fator tempo merece atenção em estudos futuros.

Puad e Abdullah (2018) reportaram uma curva de crescimento de células em suspensão de *Ficus deltoide* sem a fase lag e, então, sugeriram que as frequências de amostragens poderiam ser incrementadas visando à visualização dessa fase. Isso não é incomum quando se trata de cultivo em suspensão, principalmente no estabelecimento de protocolos (AGUILAR-CAMACHO et al., 2016).

Conforme destacado por Smith (1992), a identificação precisa dessa etapa é fundamental, pois assinala o momento ótimo para efetuar a transferência dos calos para um substrato fresco

(repicagem), devido à diminuição dos nutrientes disponíveis, desidratação do meio de cultura, acumulação de compostos tóxicos e/ou diminuição da oxigenação intracelular nos calos.

Com base nos dados fornecidos para as linhagens genéticas, podemos caracterizar o padrão de crescimento em termos de metabolismo da seguinte maneira: μ_{max} (d^{-1}): A taxa máxima de crescimento específico das células varia entre as linhagens, com valores que vão de 0,0102 a 0,0388 d^{-1} . Isso indica que as diferentes linhagens têm diferentes capacidades de crescimento mesmo sob condições ideais, com a linhagem L8 mostrando a maior taxa de crescimento específico e a linhagem L5 mostrando a menor.

Os valores negativos verificados variam entre -180,72 a -26,4019 dias, indicando ausência da fase lag entre as linhagens. Isso também pode indicar um tempo de adaptação ou acomodação das células ao meio de cultura antes que o crescimento ativo comece, com algumas começando a crescer mais rapidamente do que outras.

O tempo de geração (G) variou entre as linhagens, com valores que vão de 17,9 a 53,6 dias. Isso representa o tempo necessário para que a população celular dobre. Assim, linhagens com tempos de geração mais curtos (L8, L4, L7, L6 e L2) estão se replicando mais rapidamente do que aquelas com tempos de geração mais longos (L5, L3 e L1). Isso sugere que, sob certas condições, a linhagem L8 tem o potencial de crescer mais rapidamente do que as outras linhagens, e assim, respectivamente. Ou seja, entre as linhagens cultivadas em meio líquido as linhagens L6 e L2 apresentaram maior eficiência no crescimento em meio líquido.

As correlações encontradas (Tabela 2) constituem outra ferramenta indicativa que o protocolo utilizado é adequado para multiplicação de materiais embriogênicos de *E. precatoria* em suspensão. Todas as linhagens descrevem o modelo e forneceram uma descrição satisfatória do crescimento celular de *E. precatoria* em condições *in vitro*, com uma confiança estatística acima de 97,00% (teste Tukey). Assim, o modelo de Gompertz destacou-se ao demonstrar com êxito o crescimento de diferentes linhagens em relação ao meio e ao sistema de cultivo.

A contribuição inovadora deste estudo ao alcançar uma precisão elevada nos parâmetros de crescimento para as linhagens, por meio da aplicação bem-sucedida do modelo de Gompertz. Assim, este estudo contribui para a compreensão dos padrões existentes entre as linhagens de calos embriogênicos de açaí-solteiro. A caracterização dessas diferenças é essencial para o desenvolvimento de estratégias de cultivo mais eficientes e para a conservação da diversidade genética dessa importante espécie.

O modelo de Gompertz revelou-se robusto em comparação às abordagens convencionais em experimentos realizados por Martinez et al. (2018) que verificaram a cinética e modelagem do crescimento celular para potencial indução de antocianinas em culturas de *Taraxacum*

officinale G.H. Weber ex Wiggers (Dente-de-leão) *in vitro*. Os autores concluíram que o uso de modelos matemáticos para compreender o aumento e a concentração de antocianinas em calos de *Taraxacum* constitui uma estratégia eficaz para antecipar produções e reações em variadas condições ambientais.

Mavituna e colaboradores (2016), aplicando modelagem para entender as mudanças na distribuição de tamanho de agregados de células vegetais durante o crescimento em suspensão de *Capsicum frutescens* cultura, verificaram que a alocação de modelos computacionais tem potencial para ser utilizado de forma preditiva na elaboração de experimentos em culturas de células vegetais.

Uma alta taxa máxima de crescimento específico das células pode indicar uma maior capacidade de crescimento sob condições favoráveis. Deve-se atentar que, neste estudo, as concentrações iniciais de materiais inoculadas foram diferentes. Então, as diferentes linhagens genéticas demonstraram variações significativas em sua capacidade de crescimento máximo, implicando no tempo de resposta e taxa de replicação celular. Assim, as linhagens genéticas de açaí-solteiro podem ser consideradas eficientes quanto ao cultivo em suspensão. Essas diferenças podem ser influenciadas por uma série de fatores genéticos e ambientais, sendo importante ressaltar que outros fatores também podem influenciar o crescimento celular, como a disponibilidade de nutrientes, as condições de cultivo, fatores genéticos adicionais, entre outros (ZHANG et al., 2021).

As curvas não demonstraram um crescimento sigmoide característico definido. As linhagens adentraram diretamente com a fase exponencial, seguida pela fase linear sem haver o término característico da fase estacionária. Portanto, as linhagens aqui estabelecidas podem manter-se por longos períodos em condições sadias, embora ainda não se tenha dados das etapas posteriores da ES. Deve levar em consideração a quantidade de meio em que as linhagens foram cultivadas. Conhecer o tempo ideal de cada fase é um fator chave para manter os cultivos em condições favoráveis no laboratório para utilizações eventuais futuras (KONG et al., 2023).

Correlações do crescimento entre as linhagens avaliadas por análise de componentes principais

A aplicação da estatística multivariada, por meio da análise dos componentes principais (PCA), permitiu observar as interações existentes entre linhagens. As suspensões analisadas no presente trabalho apresentaram grupos distintos quanto a semelhanças de desenvolvimento (Figure 8).

Linhagens cultivadas em meio semissólido (L4, L7 e L8) ficaram em um grupo. Já as linhagens cultivadas em meio líquido apresentaram padrões distintos entre si. A posição oposta entre as linhagens L6 e L2 claramente evidencia uma correlação muito baixa, embora ambas tenham os maiores incrementos de massa (g) entre as linhagens cultivadas em meio líquido.

Ferreira et al. (2022a) avaliaram o meio de Y3 como a melhor opção para multiplicação de calos embriogênicos oriundos de embriões zigóticos de *E. precatória* em meio semissólido. Neste estudo, os resultados do PCA mostram que o cultivo em suspensão de linhagens embriogênicas de embriões zigóticos podem ser realizados em meio MS, suplementado com 5 µM de Picloram. Esse fato pode ser observado no PCA pela posição de plotagem da linhagem L6, mostrando claramente o efeito positivo do rendimento de incremento de massa (g) da linhagem (Figura 8).

O meio líquido demonstrou diferentes respostas embriogênicas, linhagens mais responsivas e isoladas, como foi o caso das linhagens L6 (material somático de embrião zigótico) e L2 (material somático de folhas? imaturas). Demonstrou também linhagens menos responsivas, como foi o caso da linhagem L5 (material somático de inflorescências imaturas). Tais aspectos também foram observados por Mello et al. (2023), analisando a indução da embriogênese somática em segmentos de mudas de *Euterpe edulis*.

Em *Phytolacca americana* L., conhecida popularmente como erva-de-tintureiro, a análise de componentes principais (PCA) e a análise de cluster hierárquico (HCA) revelaram diferentes padrões de resposta entre os meios semissólidos e líquidos suplementados com ácido naftalenoacético (ANA). Os pesquisadores utilizaram meio líquido e semissólido e tratamentos com auxinas na folha da erva-cidreira. Foram utilizados meios MS semissólidos e líquidos, suplementados com ácido indol-3-butírico (IBA) e ácido 1-naftilacético (NAA) em concentrações de 0,5, 1, 2 e 4 mg/L (TRUNJARUEN et al., 2023).

Assim, o biplot PCA evidencia incrementos consideráveis de massas embriogênicas de açaf-solteiro em culturas líquidas, representadas, principalmente, pelas linhagens L6 e L2.

Análises bioquímicas

Constataram-se diferenças significativas nos teores de AST entre as linhagens. Linhagens cultivadas no meio líquido apresentaram maiores níveis de AST comparando-se com as linhagens cultivadas em meio semissólido (Figura 10). Por outro lado, como foi verificado que por algum motivo houve impedimento de melhores resultados no crescimento e desenvolvimento das linhagens, deduz-se pelos baixos níveis de AST presentes nas linhagens que este seja um dos possíveis fatores responsáveis.

A concentração, sensibilidade e transporte de reservas (diferentes açúcares endógenos) ao longo do corpo da planta podem influenciar direta e indiretamente a regulação dos processos de divisão celular e diferenciação em culturas em desenvolvimento, desempenhando um papel crucial no controle de sua morfogênese (BARTOS et al., 2018).

Gomes et al. (2014) consideraram que essa característica é relevante para promover o crescimento e desenvolvimento de calos e células, tendo em vista que durante determinadas etapas do desenvolvimento embriogênico, a composição do açúcar solúvel nos tecidos dos explantes costuma desempenhar um papel mais significativo do que a quantidade total de açúcares solúveis, muitas vezes regulando as fases específicas do processo. Por exemplo, Bartos e colaboradores (2018) verificaram a relação positiva na aquisição de competência embriogênica, quando os níveis de açúcares solúveis glicose e frutose reduziram durante a embriogênese somática em *Coffea arabica* L.

Salienta-se que sob condições *in vitro*, os materiais genéticos (explantes, calos, células) tendem a depender principalmente de fontes externas de nutrientes, o acúmulo de reservas não é uma característica proeminente em seu metabolismo (CHAGAS et al., 2003). Isso corrobora com o fato das linhagens cultivadas em meio líquido serem estatisticamente superiores, por estarem em completo contato com o meio, porém com resultados superiores nas linhagens de material somático foliar (L1, L2 e L3). A linhagem proveniente de material somático foliar obteve o maior nível de AST em meio líquido.

Por outro lado, o inverso ocorreu entre as linhagens cultivadas em meio semissólido. O menor contato físico pode ser o responsável por esse resultado. Como a análise foi realizada em um ponto específico do crescimento nas linhagens, alguns estudos podem ser mais precisos para entender esse comportamento, como por exemplo análises em função do tempo. Em estudos anteriores (NOGUEITA et al., 2007; SANTOS et al., 2008; NOGUEIRA et al., 2008; SANTOS et al., 2010; GOMES et al., 2014; BARTOS et al., 2018; SILVA et al., 2020) essas análises mostram a oscilação nos níveis dos AST em relação as fases de crescimento das culturas. Em cada etapa que antecede uma fase de crescimento, os estudiosos verificaram que os níveis de AST variam muito. Nos estudos acima mencionados, alguns evidenciaram tanto declínio nos níveis dos AST quanto o seu aumento ao longo do tempo de cultivo. Isso é justificado devido à influência de outros fatores, como o tipo de explante, a fase de crescimento, o estágio de desenvolvimento, o meio de cultivo e o tempo de cultivo.

Os carboidratos desempenham um papel fundamental ao fornecerem tanto esqueletos de carbono quanto energia para a síntese de compostos orgânicos essenciais ao metabolismo celular. Esta função pode elucidar o que ocorre durante a transição nas fases de

desenvolvimento, pois destaca a importância dos carboidratos como fonte energética (SANTOS et al., 2010).

Especificamente, uma pesquisa realizada com calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.), demonstrou resultados de incremento de massa e teores de AST inferiores aos encontrados nesse estudo. Os níveis de AST variaram entre 80 $\mu\text{g mg}^{-1}$ de MS, no início do experimento, a 10 $\mu\text{g mg}^{-1}$ de MS, no final do tempo de cultivo. O experimento durou 120 dias e os autores realizaram as análises a cada dez dias de cultivo. O segundo maior nível de AST na pesquisa ocorreu aos 70 dias de cultivo, sendo esse o tempo ideal para repicagem dos materiais, e isso não constituiu um fator de impedimento para desenvolvimento das culturas (NOGUEIRA et al., 2008).

Já os teores de AST em *Elaeis guineensis* Jacq corroboram os observados para as linhagens embriogênicas de açaí-solteiro cultivadas em meio sólido e inferiores quando comparadas com linhagens cultivadas em meio líquido. Gomes et al. (2014) verificaram maiores níveis de AST durante as etapas de aquisição e desenvolvimento da embriogênese somática nessa palmeira.

Os autores constaram diferenças significativas em função do tempo de cultivo (0 a 360 dias), ocorrendo variações nos níveis totais de açúcares solúveis durante a embriogênese somática. Os pesquisadores observaram que, no momento inicial da indução da embriogênese somática, os níveis de AST nos tecidos do explante diminuem rapidamente, ao contrário do que ocorre nos estágios de regeneração e maturação, nos quais as concentrações de açúcares solúveis totais nos cultivos aumentam de forma gradual. Isso não inibiu a obtenção de plântulas no protocolo seguido.

Bartos et al. (2018) também verificaram níveis muito inferiores de AST em *Coffea arabica*. Os calos embriogênicos apresentaram em média 60 $\mu\text{g mg}^{-1}$ de MS. Esses pesquisadores concluíram que essa característica possui importância significativa para diferenciar essas variedades, mas que não chegaram a ser um fator impeditivo para bons resultados no processo embriogênico.

É importante destacar que nas pesquisas anteriores, embora níveis baixos de AST foram constatados, essas reservas não deixaram de desempenhar funções essenciais no processo embriogênico, sendo capazes de participar da sinalização nas respostas embriogênicas. Sendo assim, o tipo de açúcar pode ser o principal fenômeno relacionados com a competência embriogênica. Todavia, sugere-se observar os níveis de AST em função de um determinado período de cultivo para obter mais as informações no processo embriogênico em *E. precatória*, bem como o tipo de açúcar contido nos tecidos dos propágulos, uma vez que conforme já

elucidado por Gomes et al. (2014), esse parâmetro pode ser mais importante que o próprio teor de AST totais contidos nos materiais genéticos.

Para proteínas (Figura 11), os níveis verificados por este estudo foram muito baixos. Ainda que a análise tenha sido realizada aos 100 dias de cultivo, não se esperava níveis tão baixos de PST. Há a possibilidade das linhagens aqui cultivadas estarem por algum motivo específico sendo prejudicadas pelas reações de Amadori e Mailhard. A reação de Amadori envolve a ligação de um açúcar redutor, como a glicose, a um aminoácido, enquanto a reação de Mailhard envolve a ligação de um açúcar redutor a uma amina primária. Essas reações são etapas importantes na glicação não enzimática de proteínas, e isso ocorre quando açúcares se ligam de forma não enzimática a resíduos de aminoácidos em proteína (QUEISSER et al., 2010). Na reação, a glicose (ou outros açúcares redutores) se liga a um resíduo de lisina ou arginina na proteína, formando um produto inicialmente reversível conhecido como produto de Amadori (MEHTA; DEETH, 2016). Assim, essas reações podem ser o fator responsável pelo impedimento para um melhor desenvolvimento das linhagens, mencionados na avaliação dos AST.

Essa reação é o primeiro passo na formação de produtos de glicação avançada (AGEs), que são compostos irreversíveis resultantes da modificação de proteínas por açúcares. Em termos de síntese de proteínas, a glicação não enzimática pode interferir na estrutura e função das proteínas. Quando as proteínas são modificadas por glicação, sua estrutura tridimensional pode ser alterada, afetando sua função biológica normal (KANDARAKIS et al. 2014).

No contexto do cultivo *in vitro* de plantas, onde a síntese de proteínas é fundamental para o crescimento e desenvolvimento das plantas, a ocorrência da reação de Amadori e a formação de AGEs podem afetar negativamente processos metabólicos e fisiológicos (KANDARAKIS et al. 2014). Isso pode ter implicações na qualidade das plantas cultivadas *in vitro*, incluindo o rendimento de biomassa, resistência a estresses bióticos e abióticos, e qualidade nutricional (OLIVEIRA, et al., 2016).

Fatores como tempo de cultivo, temperatura, umidade elevada e pH do sistema podem favorecer as reações de Amadori e Mailard (PURLIS, 2010). No cultivo *in vitro*, a presença de um ambiente de alta umidade é comum, o que favorece tais reações. Isso pode resultar na inativação de proteínas, levando a uma redução dos níveis proteicos nos tecidos (SANTOS et al., 2010).

Levando em conta os aspectos mencionados anteriormente, as principais abordagens para reduzir a reação de Maillard incluem: escolher variedades com baixo teor de açúcares redutores, ajustar as condições ou tecnologias do processo térmico sempre que possível, regular o pH,

adicionar antioxidantes e utilizar compostos redutores (FURRER; CHEGENI; FERRUZZI, 2018). Zhang et al. (2017) mostraram que variações na temperatura e na umidade afetaram significativamente a expressão de genes relacionados à síntese de proteínas em *Arabidopsis thaliana*.

Em análise bioquímica de calos de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.), espécie de importância econômica na produção de biodiesel, Santos et al. (2010) verificaram padrões bioquímicos muito parecidos com os resultados desta pesquisa. Elevados teores de AST e níveis muito baixos de PST. Uma outra informação importante nesse estudo foi o fato de que os níveis mais baixos de PST coincidiram com os níveis mais elevados de açúcares redutores (AR), e que elevados teores de AR podem induzir modificações químicas nas proteínas, favorecendo as reações de Amadori e Mailhard.

Proteínas de sinalização desempenham um papel crucial na comunicação entre as células e na regulação do crescimento e diferenciação celular. Hormônios vegetais, como as auxinas e citocininas, são conhecidos por influenciar a formação e crescimento de calos embriogênicos, agindo através de vias de sinalização específicas mediadas por proteínas. Estudos têm demonstrado que a modulação da concentração e distribuição de auxinas e citocininas podem afetar significativamente a formação e morfologia dos calos embriogênicos (SU et al., 2016).

Modificações na composição do meio de cultivo são fundamentais para melhorias na síntese de proteínas, que possam induzir o metabolismo celular e assim favorecer a o crescimento e desenvolvimento celular das linhagens, como por exemplo os níveis de auxinas e citocininas, os níveis de suplementos vitamínicos e aminoácidos já testados em outros estudos. Alwael et al. (2017) verificaram que a dição de ABA na suspensão melhorou os níveis de proteínas no cultivo de *P. dactylifera* L. Mello et al. (2023) verificaram que o meio líquido contendo 15 µM de Picloram induziu o melhor crescimento de calos friáveis de *E. edulis*.

Em sua pesquisa sobre as reações de escurecimento não enzimático envolvendo diferentes sistemas de aminoácidos, Hemmler et al. (2018) ao estudarem as reações de oxidação (escurecimento) não-enzimáticos com diferentes sistemas de aminoácidos, mostraram que a lisina, a cisteína, a isoleucina e glicina foram capazes de minimizar os produtos gerados pela reação de Maillard. Pacheco, Christian e Feng (2012) durante seu estudo sobre inibidores da reação de Maillard em cana-de-açúcar, verificaram que 0,1% de cisteína reduziu significativamente o escurecimento não enzimático em um sistema contendo asparagina, glutamina e glicose.

Portanto, aminoácidos, como a cisteína, podem ser considerados como uma possível solução visando controlar os níveis proteicos e oxidativos resultante das reações de Amadori e

Mailhard (NOOSHKAM; VARIDI; BASHASH, 2019). Os aminoácidos desempenham um papel crucial como fontes de nitrogênio orgânico durante o transporte e a síntese de proteínas no processo de embriogênese somática (LLEBRÉS et al., 2018).

Outro aminoácido importante é a glicina, que contribui para a estabilidade das membranas celulares vegetais e das proteínas em condições de estresse. Isso resulta em uma maior capacidade das plantas em tolerar variações de salinidade e temperaturas extremas. Embora o papel da glicina como inibidor das rações não esteja completamente esclarecido, evidências indicam que ela mantém a estabilidade das membranas das células vegetais e proteínas sob condições de estresse, aumentando a tolerância a salinidade, altas e baixas temperaturas (SUN et al., 2020).

Assim, esses resultados podem explicar algumas dificuldades no processo embriogênico de *E. precatória*, onde há um grande gargalo de informações com relação as proteínas envolvidas no crescimento de calos embriogênicos. Uma compreensão mais aprofundada do papel das proteínas nesse processo não apenas amplia nosso conhecimento fundamental sobre o desenvolvimento vegetal, mas também tem implicações práticas significativas na biotecnologia vegetal para aprimoramento de características agrônômicas programas de melhoramento.

CONCLUSÃO

Calos friáveis embriogênicos de *Euterpe precatória* podem ser estabelecidos e multiplicados em meio líquido. O potencial de multiplicação em meio líquido desses calos é influenciado pela linhagem utilizada. O meio líquido surge como alternativa viável para propagação vegetativa, visto que há formação de novos calos no meio.

Neste trabalho, as linhagens L2 (folhas imaturas) e L6 (embrião zigótico) apresentam a maiores taxas de multiplicação e menor tempo de resposta. O melhor potencial embriogênico é atingido entre 90 e 120 dias de cultivo em meio líquido. A cinética do crescimento descrita pela modelagem de Gompertz pode ser utilizada para descrever as fases de crescimento em suspensão da espécie, elucidando o comportamento das linhagens em cada fase.

As linhagens cultivadas em meio líquido apresentam teores de açúcares mais elevados que o semissólido. O teor de proteínas nas linhagens é baixo, que pode ser afetada pelos estádios de desenvolvimento ou ausência de aminoácidos;

A multiplicação apresenta comportamento significativo ao longo dos subcultivos, tanto entre linhagens quanto entre períodos de cultivo;

O cultivo de *Euterpe precatoria* no sistema líquido *in vitro* mostra-se promissor, podendo ser utilizado também para obtenção de matérias-primas padronizadas como metabólicos secundários para fins farmacêuticos e medicinais e outros. A otimização das concentrações de sais minerais no meio de nutrientes, bem como a realização da diferenciação de embriões somáticos em meio líquido, seguida de regeneração em biorreatores, serão objetos de pesquisas futuras para garantir o desenvolvimento de um protocolo completo e eficiente de propagação clonal de *E. precatoria*.

REFERÊNCIAS

ABOHATEM, M.A.; BAKIL, Y.; BAAZIZ, M. Plant regeneration from somatic embryogenic suspension cultures of date palm. In: Al-Khayri JM, Jain SM, Johnson DV (eds) Date Palm Biotechnology Protocols Volume I: **Tissue Culture Applications**. Humana Press New York, pp 203–214, 2017. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7156-5_17.

AGUILAR-CAMACHO, M., GÓMEZ-SÁNCHEZ, C.E., CRUZ-MENDÍVIL, A. et al. Modeling the growth kinetics of cell suspensions of **Randia echinocarpa** (Rubiaceae) and characterization of their bioactive phenolic compounds. **Plant Cell Tiss Organ Cult.**, 155, 785–796 (2023). <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02599-z>.

AL-KHAYRI, J.M. Determination of the date palm cell suspension growth curve, optimum plating efficiency, and influence of liquid medium on somatic embryogenesis. **Emir. J. Food Agric.** 2012. 24 (5): 444-455.

ALWAEEL H.A.; NAIK, P.M.; AL-KHAYRI, J.M. (2017) Synchronization of somatic embryogenesis in date palm suspension culture using abscisic acid. In: Al-Khayri JM, Jain SM, Johnson DV (eds) Date Palm. **Biotechnology Protocols** Volume I: Tissue Culture Applications. Springer New York, New York, NY, pp 215–226. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7156-5_18.

AMINE MAZRI, M. E MEZIANI, R. (2015). Micropropagação de tamareira: A Análise. **Célula & Desenvolvimento Biologia**, 04(03). <https://doi.org/10.4172/2168-9296.1000160>. (MAZRI MA, MEZIANI R (2015) Micropropagation of Date Palm: A Review. **Cell Dev Biol** 4: 160. D)

ARIAS, J.; ZAPATA, K.; ROJANO, B.; ARIAS, M. (2016). Effect of light wavelength on cell growth, content of phenolic compounds and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 163, 87-91.

BAKER, W.; NORUP, M.V.; CLARKSON, J.J. COUVREUR, T.L.P.; DOWE, J.L.; LEWIS, C. E. et al. Phylogenetic relationships among arecoid palms (Arecaceae: Arecoidae). *Ann Bot.* 108, 1417-14-1432. Doi: 10.1093/aob/mcr020.

BARTOS, P.M.C.; GOMES, H.T.; DO AMARAL, L.I.V.; TEIXEIRA, J.B.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Biochemical events during somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. **3 Biotech.** 2018 Apr;8(4):209. doi: 10.1007/s13205-018-1238-7. Epub 2018 Apr 6. PMID: 29651374; PMCID: PMC5889373.

BEIGMOHAMADI M, MOVAFEGHI A, SHARAFI A, JAFARI S, DANAFAR H. Cell Suspension Culture of *Plumbago europaea* L. Towards Production of Plumbagin. **Iran J Biotechnol.** 2019 Apr 20;17(2):e2169. doi: 10.21859/ijb.2169. PMID: 31457059; PMCID: PMC6697843.

BHATIA, S., 2015. Plant tissue culture. In: Bhatia, S., Sharma, K., Dahiya, R., Bera, T. (Eds.), Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences, first ed. **Academic Press, Boston**, pp. 31–107. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802221-4.00002-9>.

CHAGAS, E.A. et al. Development of globular embryos from the hybridization between ‘Pêra Rio’ sweet orange and ‘Poncã’ mandarin. **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal**, v.25, n.3, p.483-488, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbf/v25n3/18674.pdf>> doi: 10.1590/S0100-29452003000300031

DUBOIS M, GILLES KA, HAMILTON JK, REBERS PT, SMITH F (1956).Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal Chem** 28(3):350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>.

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**, Copenhagen, v. 36, n. 1, p. 23-28, 1976.

FERREIRA, C.D.; SILVA-CARDOSO, I.M.A.; FERREIRA, J.C.B.; COSTA, F.H.S.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Morphostructural and histochemical dynamics of *Euterpe precatoria* (Arecaceae) germination. **J Plant Res.**, 133:693–713, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10265-020-01219-7>

FERREIRA, J.C.B.; DE ARAÚJO SILVA-CARDOSO, I.M., MEIRA, R.O.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Towards development of an efficient somatic embryogenesis protocol for the palm tree *Euterpe precatoria* (Mart.) from leaf tissues of adult plants. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant** 58, 750–768, 2022a. <https://doi.org/10.1007/s11627-022-10310-8>

FERREIRA, D. S., GOMES, A. L., SILVA, M. G. DA, ALVES, A. B., AGNOL, W. H. D., FERRARI, R. A., & PACHECO, M. T. B. (2016). Antioxidant capacity and chemical characterization of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) fruit fractions. **Food Science Technology**, 4(5), 95-102.

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

FURRER, A. N.; CHEGENI, M.; FERRUZZI, M. G. Impact of potato processing on nutrients, phytochemicals, and human health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 1, p. 146-168, 2018.

GOMES, H. T.; BARTOS, P. M. C.; SILVA, C. O.; AMARAL, L. I. V.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Comparative biochemical profiling during the stages of acquisition and

development of somatic embryogenesis in African oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Growth Regulation**, v.74, p.199-208, 2014.

GORDON, A., CRUZ, A. P. G., CABRAL, L. M. C., FREITAS, S. C. DE, TAXI, C. M. A. D., & DONANGELO, C. M. Chemical characterization and evaluation of antioxidante properties of acai fruits (*Euterpe oleracea* Mart.) during ripening. *Food Chemistry*, 133(2), 256-263, 2012.

GUILLOU, C., FILLODEAU, A., BRULARD, E. *et al.* Indirect somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. in liquid medium and improvement of embryo-to-plantlet conversion rate. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* **54**, 377–391 (2018). <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9909-y>.

GUTIÉRREZ-GAMBOA G., MORENO-OSORIO L., & GUTIÉRREZ-MACÍAS L. (2020). Growth kinetics and metabolite content in *Vitis vinifera* L. cv. red globe cell suspension cultures supplemented with tannic acid and methyl jasmonate. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** (PCTOC), 141(1), 51-61

HUA, M.; HUA, Z.; DUA, L.; DU, J.; LUO, Q.; XIONG, J. Establishment of cell suspension culture of *Lonicera japonica* Thunb and analysis its major secondary metabolites. **Industrial Crops and Products**, v.137, p. 98-104, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.05.024>

JAMIL, S.Z.M.R., ROHANI, E.R., BAHARUM, S.N. et al. Metabolite profiles of callus and cell suspension cultures of mangosteen. **3 Biotech** **8**, 322 (2018). <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1336-6>.

JIE, E.Y., AHN, M.S., LEE, J.; CHEON, Y.I.; KIM, C.Y.; KIM, S.W.. Establishment of a high-frequency plant regeneration system from rhizome-derived embryogenic cell-suspension cultures of *Curcuma longa* L. *Plant Biotechnol Rep* **13**, 123–129 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11816-019-00519-2>.

KANDARAKIS, S. A.; PIPERI, C.; TOPOUZIS, F.; & PAPA VASSILIOU, A. G. Emerging role of advanced glycation-end products (AGEs) in the pathobiology of eye diseases. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 42, p. 85-102, 2014.

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.

KONG, E.Y.Y.; BIDDLE, J.; FOALE, M.; ADKINS, S.W. Cell suspension culture: A potential in vitro culture method for clonal propagation of coconut plantlets via somatic embryogenesis. **Industrial Crops and Products**, v. 147, n. 112125, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112125>.

HEMMLER, D. et al. Insights into the chemistry of non-enzymatic browning reactions in different ribose-amino acid model systems. **Scientific Reports**, v. 8, n.1, p.1-10, 2018.

HONORIO, A.B.M.; SOUSA, R.M.; MARINHO, P.H.A.; LEAL, T.T.A.B.; SOUZA, P.B. Germinação de sementes de *Euterpe oleraceae* (Mart.) em diferentes substratos. **Agrarian Academy**, - Goiânia, v.4, n.7; p. 280- 288. 2017.

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.

KHAIRUDDIN, N. L. A.; OTHMAN, R. Y.; TAN, C. C. High frequency of somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cell suspension culture of *Elaeis guineensis* Jacq. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, 144(2), 291-301. 2021.

KONG, E.Y.Y.; BIDDLE, J.; KALAIPANDIAN, S.; ADKINS, S.W. Coconut Callus Initiation for Cell Suspension Culture. **Plants**. 2023, 12, 968. <https://doi.org/10.3390/plants1204096>.

LING, A.P.K.; HALMI, M.I.E.; HUSSEIN, S; ONG S.L. Modelling the Effect of 2-4, D on the Growth Kinetics of Cell Suspension Cultures of *Ficus deltoidea* L. **Journal of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 1-5, 2015.

LISBOA, C. R. .; OLIVEIRA, M. do S. P. de .; CHISTÉ, R. C. .; CARVALHO, A. V. Bioactive compounds and antioxidant potential of different accessions of *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria* from the active açai germoplasm bank . **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 11, n. 12, p. e428111234824, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i12.34824. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/34824..>

LLEBRÉS MT, PASCUAL MB, DEBILLE S, TRONTIN JF, HARVENGT L, AVILA C, CÁNOVAS FM. (2018) The role of arginine metabolic pathway during embryogenesis and germination in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). **Tree Physiol**, 38(3):471–484. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpx133>

MANOKARI, M.; SAURABHKUMAR, R. M.; PRIYADHARSHINI, S.; MAHESH, K. B.; JAYAPRAKASH, K.; COKUL, R. M.; MAHIPAL, S. S. Histochemical basis of the distinct anatomical features and characterization of primary and secondary metabolites during somatic embryogenesis in *Santalum album* L.. **Trees**. 36, 215–226, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00468-021-02199-4>.

MARTÍNEZ, M.E.; POIRRIER, P.; PRUFER, D.; SCHULZE, G. C.; JORQUERA, L.; FERRER, P.; DÍAZ, K. CHAMY, R. (2018). Kinetics and modeling of cell growth for potential anthocyanin induction in cultures of *Taraxacum officinale* G.H. Weber ex Wiggers (Dandelion). *Electron J Biotechnol*, vol 36, p. 15-23, 2018.

MAVITUNA, F., YOON, S.-Y. H., & PARK, J. M. (2016). Modelling size distribution changes of plant cell aggregates during batch growth of *Capsicum frutescens* suspension culture. *Chemical Engineering Science*, 148.

MEHTA, B. M.; DEETH, H. C. Blocked Lysine in Dairy Products: Formation, Occurrence, Analysis, and Nutritional Implications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 15, 2016.

MELO, G.S.; SOUZA, F.C.; SILVA, L.C. O cenário da produção do açai (*Euterpe* spp.) no estado do Amazonas. **Revista Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.7, p. 71536-71549 jul. 2021.

MELLO, T., SILVA, T. D., ZANARDO, T. É. C., et al. (2024). Somatic embryogenesis in *Euterpe edulis* Martius is improved by wounding, explant orientation, and suspension culture. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, 156, 31. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02649-6>

MONTEIRO, T. R., FREITAS, E. O., NOGUEIRA, G. F., & SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.. Assessing the influence of subcultures and liquid medium during somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 93, n. 2, p. 196-203, 2018. DOI: 10.1080/14620316.2017.1360156

MOHAMAD PUAD, NI, ABDULLAH, TA (2018). Monitoring the growth of plant cells in suspension culture. In: Amid, A., Sulaiman, S., Jimat, D., Azmin, N. (eds) **Multifaceted Protocol in Biotechnology**. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2257-0_17

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

MUSTAFA NR, DE WINTER W, VAN IREN F, VERPOORTE R (2011) Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. **Nat Protoc** 6:715–742.

NASCIMENTO-GAVIOLI, M.C.A., CANGAHUALA-INOCENTE, G.C., STEINMACHER, D. et al. Physiological and biochemical features of embryogenic and non-embryogenic peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) cultures. **In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant** 53, 33–40 (2017). <https://doi.org/10.1007/s11627-017-9805-x>

NAIK, P.M. AL-KHAYRI, L.M. Cell suspension culture as a means to produce polyphenols from date palm (*Phoenix dactylifera* L.) **Ciência e Agrotecnologia**, v. 42, n.5, p.464-473, 2018.

NAIK, M.P.; AL-KHAYRI, J.M. Somatic Embryogenesis of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Through Cell Suspension Culture. In: MOHAN JAIN (ed.), **Protocols for In Vitro Cultures and Secondary Metabolite Analysis of Aromatic and Medicinal Plants, Second Edition, Methods in Molecular Biology**, vol. 1391, DOI 10.1007/978-1-4939-3332-7_25, © Springer Science+Business Media New York 2016.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L. M.; SOARES, G. A.; SOARES, F. P.; CASTRO, A. H. F.; PAIVA, P. D. O. (2007). Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 366-370, mar./abr.

NOGUEIRA, R.C. et al. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu**, v.10, n.1, p.44-48, 2008. Disponível em: < [http:// www.ibb. unesp.br/rbpm /pdf_v10_n1_2008/](http://www.ibb.unesp.br/rbpm/pdf_v10_n1_2008/)

NOOSHKAM, M.; VARIDI, M.; BASHASH, M. The Maillard reaction products as food-born antioxidant and antibrowning agents in model and real food systems. **Food Chemistry**, v. 275, n.1, p. 644-660, 2019.

O'BRIEN T. P.; MCCYLLY, M. E. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Melbourne: Termarcarphi PTY. LTD, 1981.

OLIVEIRA, F. C. et al. Food protein-polysaccharide conjugates obtained via the Maillard reaction: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 7, p. 1108-1125, 2016.

OLIVEIRA, J.F.; FERREIRA, A.C.; FREITAS, H.F.; RAGHIANTE, F.; BIONDI, G.F.; MARTINS, O. A. Análises físico-química e microbiológica de palmito em conserva do tipo Açai (*Euterpe oleracea*). **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, 11(1), 8-18, 2017.

OLIVEIRA, M.S.P.; MATTIETTO, R.A.; DOMINGUES, A.F.N.; CARVALHO, A.C.; OLIVEIRA, N.P.; FARIAS NETO, J.T. *Euterpe oleracea* e *E. precatoria*, Açai. In: CORADIN, L.; CAMILLO, J.; VIEIRA, I.C.G (Ed.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região Norte**. Brasília, DF: MMA, 2022. (Série Biodiversidade; 53). 1452p.

PANGGABEAN, N. H.; NURWAHYUNI, I.; ELIMASNI; BASYUNI, M. (2023). Somatic Embryogenesis of Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from Bud Explants Using Suspension Culture. **OnLine Journal of Biological Sciences**, 23(2), 236-242. <https://doi.org/10.3844/ojbsci.2023.236.242>

PACHECO, M. D.; CHRISTIAN, J. I.; FENG, B. Study of Maillard reaction inhibitors for the sugar cane processing. **American Journal of Food Technology**, v. 7, n. 8, p. 470-478, 2012.

POLESI, L.G.; FRAGA, H.P.F.; GOETEN, D. et al. Morphohistological and biochemical features of the *Guadua chacoensis* (Bambusoideae; Poaceae) somatic embryogenesis. **Plant Cell Tiss Organ Cult** 148, 479–499 (2022). <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02199-9>.

POPOVA, E.V., NOSOV, A.V., TITOVA, M.V. et al. Advanced Biotechnologies: Collections of Plant Cell Cultures As a Basis for Development and Production of Medicinal Preparations. **Russ J Plant Physiol** 68, 385–400, 2021. <https://doi.org/10.1134/S102144372103016X>.

PURLIS, E. Browning development in bakery products—A review. **Journal of Food Engineering**, v. 99, n. 3, p. 239-249, 2010.

QUEIROZ, F.F., DE ARAÚJO SILVA-CARDOSO, I.M., SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. (2021). Initiation and Establishment of Cell Suspension Cultures in Bamboo. In: Ahmad, Z., Ding, Y., Shahzad, A. (eds) *Biotechnological Advances in Bamboo*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-1310-4_5.

QUEISSER, M. A.; YAO, D.; GEISLER, S.; HAMMES, H. P.; LOCHNIT, G.; SCHLEICHER, E. D.; ...& PREISSNER, K. T. **Diabetes**, v. 59, n. 3, p. 670-678, 2010.

RAMCHANDRA, S.S.; BHATT, P.N. ; BHATT, D.P. 2020. Callus Induction and Establishment of Cell Suspension Culture of Cumin (*Cuminum cyminum* L.). **Journal of Plant Sciences**, 15: 54-63.

RAMOS, S. L. F. ; DEQUIGIOVANNI, G. ; LOPES, MARIA TERESA GOMES ; AGUIAR, A. V. ; LOPES, R. ; VEASEY, E. A. ; MACEDO, J. L. V. ; ALVES-PEREIRA, A. ; FRAXE, T. J. P. ; WREGE, M. S. ; GARCIA, J. N. . Genetic structure in populations of *Euterpe*

precatória Mart. in the Brazilian Amazon. **FRONTIERS IN ECOLOGY AND EVOLUTION**, v. 1, p. 1-11, 2021.

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/>>.

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

SAINI, R. K., NILE, S. H., & PARK, S. W. Carotenoids from fruits and vegetables: chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. **Food Research International**, 76, 735-750, 2015.

SALUM, U.; FOALE, M.; BIDDLE, J.; BAZRAFSHAN, A.; ADKINS, S. Towards the sustainability of the “tree of life”: **An introduction. In Coconut Biotechnology: Towards the Sustainability of the ‘Tree of Life’**; ADKINS, S., FOALE, M., BOURDEIX, R., NGUYEN, Q., BIDDLE, J., EDS.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, pp. 1–15. 2020.

SANTOS, C. G. et al. Indução e análise bioquímica de calos em segmentos foliares e nodais de *Coffea canephora* L. cv. Apoatã. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 20, n. 1, p. 22-29, jan./mar. 2008.

SANTOS, D. N. DOS; NUNES, C. F.; PASQUAL, M.; VALENTE, T. C. T.; OLIVEIRA, A. C. LI. DE; SILVEIRA, N. M. Análise bioquímica de calos de pinhão-mansão. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.11, p.2268-2273, nov. 2010.

SANTOS, M.R.A. ROCHA, J.F. FERREIRA, M.G.R. CORREIRA, A.O. Estabelecimento in vitro e calogênese em explantes foliares de pupunheira. **Rev. Cienc. Agrar.** v. 55, n. 3, p. 197-203, jul./set. 2012.

SANTOS, D. N. et al. Análise bioquímica de calos de pinhão-mansão. **Revista Ciência Rural**, v. 40, n. 11, p. 2268-2273, 2010.

SILVA-CARDOSO, I.M.A.; MEIRA, F.S.; GOMES, A.C.M.M.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Histology, histochemistry and ultrastructure of preembryogenic cells determined for direct somatic embryogenesis in the palm tree *Syagrus oleracea*. **Physiol Plant** 168(4):845–875, 2019. <https://doi.org/10.1111/ppl.13026>.

SILVA, T. S.; CARVALHO FILHO, R. S. L.; TANAN, T. T.; ROCHA, T. C.; SANTANA, J. R. F. Calogênese em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 30, n. 3, p. 700-717, 2020

SMITH, R.M. Plant tissue culture: techniques and experiments. 1. ed. San Diego: **Academic Press**, 1992. 171p.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy**. The principles and practice of numerical classification. 1973, 573 p.

SOH, A. C.; WONG, G.; TAN, C. C.; CHEW, P. S.; CHONG, S. P.; HO, Y. W.; WONG, C. K.; CHOO, C. N.; NOR-AZURA, H. Kumar, K. Commercial-scale propagation and planting of elite oil palm clones: research and development towards realization. **Journal of Oil Palm Research**, v.23, p.935-952, 2011.

SONGSERM, P.; KLANRIT, P.; KLANRIT, P.; PHETCHARABURANIN, J.; THANONKEO, P.; APIRAKSAKORN, J.; PHOMPHRAI, K.; KLANRIT, P. Antioxidant and Anticancer Potential of Bioactive Compounds from *Rhinacanthus nasutus* Cell Suspension Culture. **Plants**, 2022, 11, 1994. <https://doi.org/10.3390/plants11151994>.

SU Y., LIU Y., ZHOU C., LI X., ZHANG X. (2016). The microRNA167 controls somatic embryogenesis in Arabidopsis through regulating its target genes ARF6 and ARF8. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 124, 405–417. [10.1007/s11240-015-0903-3](https://doi.org/10.1007/s11240-015-0903-3)

SUN, H. et al. Exogenous glycine betaine treatment alleviates low temperature-induced pericarp browning of ‘Nanguo’ pears by regulating antioxidant enzymes and proline metabolism. **Food Chemistry**, v. 306, p. 125626, 2020.

TRUNJARUEN, A.; LUECHA, P.; TARATIMA, W. (2023). Optimization of Medium Conditions and Auxins in Inducing Adventitious Roots of Pokeweed (*Phytolacca americana* L.) and Its Phytochemical Constituents. **Scientifica**, vol. 2023, article ID 2983812, 14 pages. <https://doi.org/10.1155/2023/2983812>.

WOO, HA.; KU, S.S.; JIE, E.Y.; KIM, H.; KIM, H.-S.; JEONG, W.-J.; PARK, S.U.; MIN, S.R.; KIM, S.W. Efficient plant regeneration from embryogenic cell suspension cultures of *Euonymus alatus*. **Sci Rep** 11, 15120 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94597-4>.

YAMAGUCHI, K. K. L., PEREIRA, L. F. R., LAMARÃO, C. V., LIMA, E. S., & VEIGA-JUNIOR, V. F. Amazon açai: Chemistry and biological activities: A review. **Food Chemistry**, 179, 137-151, 2015.

ZHANG, M. et al. Antioxidant mechanism of betaine without free radical scavenging ability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 42, p. 7921-7930, 2016.

ZHANG M, WU H, SU J, WANG H, ZHU Q, LIU Y, XU J, LUKOWITZ W, ZHANG S. Maternal control of embryogenesis by MPK6 and its upstream MKK4/MKK5 in Arabidopsis. **Plant J.** 2017 Dec;92(6):1005-1019. doi: 10.1111/tpj.13737. Epub 2017 Nov 11. PMID: 29024034.

ZHANG, Y., ZHANG, Y., SHI, Y., HE, L., LIU, H., & WANG, J. (2021). Abiotic Stress Responses in Plants: Current Challenges and Perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, 22(9), 4533.

CAPÍTULO III

OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE CULTIVO EM SUSPENSÃO DE *Euterpe* *precatoria* Mart.

RESUMO

O açáí é uma palmeira que vai além dos seus usos tradicionais devido sua relevância nutricional e seus benefícios para a saúde humana. Assim, objetivou-se otimizar o protocolo de cultivo de açáí solteiro (*Euterpe precatoria*) em meio de consistência líquida e melhorar a produção de calos embriogênicos friáveis. Doze linhagens de calos oriundas de folhas e inflorescências imaturas foram homogeneizadas em meio semissólido, depois transferidas para cinco tipos de meios com diferentes combinações de auxinas, cultivadas em meio de suspensão por 180 dias. Os volumes foram mensurados aos 45, 90, 135, 150 e 180 dias de cultivo. A curva de crescimento foi verificada. O modelo Gompertz foi aplicado e a cinética de crescimento foi avaliada. Aplicou-se a fórmula de Sturges e as classes de volumes foram identificadas. As linhagens apresentaram diferenças estatísticas na curva de crescimento pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$) a 5% de significância. Para linhagens oriundas de folhas imaturas, a combinação de auxinas favoreceu a homogeneização das linhagens em meio líquido. Para aquelas provenientes de inflorescências imaturas, os meios sem a combinação de auxinas foram suficientes para melhorar o desempenho das linhagens. A presente pesquisa fornece evidências estatísticas de que a adição de aminoácidos e vitaminas promoveram um supercrescimento de calos embriogênicos de *Euterpe precatoria*, com um incremento no volume de até 20 vezes. As análises anatômicas revelaram que as linhagens possuem potencial embriogênica. O meio foi otimizado, embora ainda necessite de ajustes para evitar o estresse oxidativo. A análise da cinética de crescimento e a aplicação do modelo matemático de Gompertz permitiram verificar o comportamento das diferentes linhagens utilizadas. O protocolo foi otimizado e a produção de calos embriogênicos friáveis foi melhorada tanto em linhagens folhas imaturas quanto em linhagens de inflorescências imaturas.

Palavras chaves: Açáí; células em suspensão; agregados celulares; anatomia de calos; meio líquido

ABSTRACT

Açaí is a palm tree that extends beyond its traditional uses due to its nutritional relevance and health benefits to humans. Açaí is so crucial to human nutrition that it has earned another title, that of a 'superfruit', further enhancing its economic importance. Therefore, the objective of this research was to optimize the single culture protocol of açaí (*Euterpe precatoria*) in liquid consistency medium and to enhance the production of friable embryogenic calli. Twelve somatic material strains from leaves and immature inflorescences were homogenized in semi-solid medium, then transferred to five types of media with different auxin combinations, cultivated in suspension medium for 180 days. The volumes were measured at 45, 90, 135, 150, and 180 days of cultivation. The growth curve was verified. The Gompertz model was applied and growth kinetics were evaluated. The Sturges' formula was applied and volume classes were identified. Strains showed statistical differences in growth curve via the Scott-Knott test ($p < 0.05$) at 5% significance level. In immature leaves, the auxin combination favored strain homogenization in liquid medium. In immature inflorescences, media without auxin combinations sufficed to improve strain performance. This study provides statistical evidence that the addition of amino acids and vitamins promoted a super growth of *Euterpe precatoria*, capable of increasing its volume by up to 20 times. Anatomical analyzes revealed embryogenic competence among the strains. Therefore, the medium was optimized although adjustments are still needed to avoid oxidative stress. Growth kinetics analysis and application of the Gompertz mathematical model allowed verification of the behavior of different strains used. The protocol was optimized and the production of friable embryogenic calli was improved in both immature leaf and immature inflorescence strains.

Keywords: Açaí; cells in suspension; cell aggregates; callus anatomy; liquid medium.

INTRODUÇÃO

As palmeiras mantêm uma posição importante devido à capacidade de produzir diversos produtos úteis com múltiplas finalidades medicinais, alimentícias, industriais, socioculturais, socioambientais e socioeconômicas. Com ampla distribuição e abundância, as palmeiras exercem um papel tão importante, que dão suporte para a família Arecaceae alcançar a terceira posição no ranking das famílias botânicas de maior importância econômica para os seres humanos (SOUZA; LIMA, 2020).

O dendê, a tamareira e o coco são exemplos de espécies de palmeira de grande importância econômica, e o açaí uma palmeira que ingressou nesse grupo. O açaí, palmeira é nativa da floresta Amazônica, é atualmente a principal palmeira comercial no grupo dos produtos alimentícios do Brasil (IBGE, 2023), sendo de significativa importância que recebeu títulos de forte impacto econômico, como “ouro preto”, “ouro roxo” (SEDAP, 2020).

No Brasil, há mais de 20 espécies de palmeiras com potencial econômico para uso do fruto, palmito, óleo comestível e para a produção de biodiesel (SOUZA; LIMA, 2020). Nesse contexto, o açaí solteiro (*Euterpe precatoria* Mart.) vem ganhando destaque no mercado devido seu alto perfil econômico (FERREIRA et al., 2020). O açaí é atualmente a principal palmeira comercial no grupo dos produtos alimentícios do Brasil (IBGE, 2023).

O açaí é uma palmeira que vai além dos seus usos tradicionais devido sua relevância nutricional e seus benefícios para a saúde humana. O açaí recebeu outro título, o de “super fruto”, tornando-a ainda mais importante economicamente (ALVES; RAMOS, 2019; FERREIRA et al., 2020) Essas e outras características resultaram em uma grande procura pelos frutos, havendo a expansão do mercado de açaí principalmente para a Estados Unidos, Japão e países da Europa (IBGE, 2023).

Essa demanda em alto nível faz com que novas tecnologias de produção para a cultura do açaí sejam necessárias. O açaí é propagado por semente, desprovido de propagação vegetativa natural (FERREIRA et al., 2022). O modo natural de propagação do açaí gera heterogeneidade, causando frutos com qualidade diversificada, de baixo nível devido a variação dos indivíduos em campo (NAIK; AL-KHAYRI, 2018). Tais aspectos tornam plantios limitados, podendo não corresponder a demanda necessária. Assim, são urgentes pesquisas que otimizem o seu processo de produção. No entanto, a clonagem em grande escala, para diferentes espécies de palmeiras de valor econômico, só é possível por meio da técnica de embriogênese somática (SE) (NAIK; AL-KHAYRI, 2016; FERREIRA et al., 2022).

Considerada a principal técnica de propagação vegetativa nesses vegetais (KONG et al., 2023), a ES quando completamente dominada, contribui de forma eficiente na regeneração de

plantas completas e geneticamente idênticas (SILVA; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2018) e no aperfeiçoamento de programas de melhoramento genético. Isso ocorre graças ao mecanismo da totipotência das células dos vegetais (FEHÉR, 2019), onde células que já passaram por diferenciação adotam um novo caminho, e esse novo caminho é justamente a formação de embriões somáticos (WÓJCIK et al., 2020). Assim, as células desdiferenciam-se, havendo por seguinte a ativação de um novo ciclo de divisão celular e também uma reprogramação e sinalização que envolve diversos parâmetros metabólicos/moleculares, bioquímicos e fisiológicos que irão desenvolver um padrão de expressão gênica (MÉNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019).

Os meios de consistência líquida podem otimizar as etapas da ES, pois através do cultivo de materiais genéticos em suspensão pode-se obter populações mais homogêneas e também aumentar a produção de materiais genéticos com potencial embriogênico, (KONG et al., 2020). Tais fatos estão ligados ao contato direto com o meio nutritivo (MONTEIRO et al., 2018), garantido maior absorção (MUSTAFA, et al., 2011). Esses fatores podem favorecer a capacidade de divisão celular e possibilitar uma uniformidade nos diferentes estágios de desenvolvimento (CABRAL et al., 2015).

Em culturas inoculadas em meio líquido, usa-se o calo embriogênico visando à diferenciação de embriões somáticos. Esse fato dá condição para uma estrutura benéfica e uma troca eficiente de gases e nutrientes, facilitando a divisão celular (MONTEIRO et al., 2018). Assim, são facilmente separadas em meio líquido, tornando uma material genético ideal para o cultivo em suspensão celular, com foco em aumentar a produção materiais embriogênicos somáticos (ZEBO LIU et al., 2022).

Muito embora um recente protocolo tenha sido desenvolvido em meio de consistência líquida para a espécie, ainda há aspectos a serem otimizados, como a quantidade de meio utilizada, a frequência do subcultivo, uso de aminoácidos ou L-prolina, reguladores de crescimento, quantidade de nutrientes presentes no meio de cultivo e a quantidade de material inoculado (KONG et al., 2023).

Optou-se por utilizar materiais oriundos de tecidos foliares e inflorescências por se tratar de material somático. Muito embora calos de inflorescências sejam ainda negligenciados, é uma alternativa viável nos protocolos de ES pela elevada disponibilidade de propágulos para início de trabalhos, pelo ótimo potencial embriogênico (SILVA-CARDOSO et al., 2019), além de ser um material de baixa contaminação durante o estabelecimento dos cultivos *in vitro* (REE e GUERRA, 2015), caracterizando esse tipo de material genético como um propágulo que facilita a clonagem da matriz doadora (SILVA-CARDOSO et al., 2019).

Assim, este estudo objetivou investigar a influência de fatores diversos associados aos meios de cultivo sobre a taxa de formação de calos embriogênicos de açai solteiro (*E. precatoria*), oriundos de tecidos foliares e de inflorescências imaturas, visando otimizar a sua produção em escala maior. Adicionalmente, realizaram-se análises anatômicas para investigar as diferenças estruturais entre as linhagens de calos cultivadas nos diferentes meios.

MATERIAL E MÉTODO

Local de condução da pesquisa

A presente pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Cultura de Tecidos e Genética Vegetal, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília – DF.

Caracterização das linhagens e condições de cultivo

Utilizaram-se calos provenientes de tecidos foliares jovens (palmito – folhas aclorofiladas e não expandidas) e de segmentos de inflorescências imaturas de plantas adultas de *Euterpe precatoria* Mart., que estavam sob manutenção em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C. As matrizes de onde os materiais foram coletados são provenientes do estado do Acre, na região Norte do Brasil, na Amazônia ocidental brasileira (Fig. 1).



Figura 1. Palmeira *Euterpe precatoria* Mart. (açai-solteiro) cultivada na Unidade Federativa do Acre, região norte do Brasil. **A e D.** Representação da palmeira açai-solteiro com cachos de frutos e inflorescência. **B.** Representação dos frutos ainda no cacho. **C.** Plantio de açai-solteiro pertencente à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA. Fotos cedidas e autorizadas para publicidade por Daniel de Almeida Papa. Funcionário da EMBRAPA-ACRE.

Posteriormente, os calos foram postos em um mesmo meio de cultivo (meio de multiplicação), com finalidade de homogeneização das culturas/dos setores a serem inoculados posteriormente em meio líquido. Para tanto, utilizou-se aproximadamente 25 mL em placas de Petri (90 x 15 mm), lacradas com filme policloreto de polivinila (PVC) transparente (Lusafilm R105®, Brasil), do meio básico de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com 20 µM de ácido 4-amino-3, 5, 6-tricloropicolínico (Picloram) , 5 µM da citocinina de 2-isopenteniladenina (2iP), 30 g L⁻¹ sacarose, 0,5 g L⁻¹ de caseína hidrolisada, 0,5 g L⁻¹ de cisteína, 0,5 g L⁻¹ de glutamina e 2,3 g L⁻¹ do agente gelificante *Phytagel* (Sigma, St. Louis, MO®), com 2,5 g L⁻¹ de carvão ativado, conforme Ferreira (2020), Ferreira et al. (2022a) e Ferreira et al. (2022b). Os materiais foram mantidos sob ausência de luz por 60 dias para reindução dos setores embriogênicos.

Uma vez reinduzidos, os calos globulares de consistência friável foram inoculados em frascos de Erlenmeyer de 125 mL de capacidade, com volume inicial de 20 mL de meio de cultura e pH ajustado para 5,7 ± 0,1 antes da esterilização em autoclave a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos, conforme Monteiro et al. (2018). Aos 45 dias, verificou-se o estabelecimento em meio líquido.

Consideraram-se como suspensões estabelecidas aquelas que mantiveram a ocorrência de calos intumescidos pelo aumento do volume do calo, erlenmeyers com do aumento da densidade dos propágulos, e frascos em que os propágulos não eram afetados pela oxidação ao ponto de comprometer o crescimento em suspensão.

A composição e a designação de cada meio utilizado estão dispostas na tabela a seguir (Tabela 1).

Tabela 1: Designações e formulações dos meios testados usando diferentes combinações de auxinas, para estabelecimento e multiplicação de agregados celulares e células em suspensão oriundos de tecidos foliares jovens (palmito – folhas aclorofiladas e não expandidas) e de segmentos de inflorescências imaturas de plantas adultas de *Euterpe precatoria* Mart.

Designação do meio		
M1	M2	M3
5 µM de Picloram	5 µM de Picloram	5 µM de Picloram
-	-	-
-	-	0,1 mg.L ⁻¹ ANA
-	4,92 µM AIB	-
20 g L ⁻¹ de sacarose	20 g.L ⁻¹ de sacarose	20 g.L ⁻¹ de sacarose
0,5 g L ⁻¹ de glutamina	0,5 g.L ⁻¹ de glutamina	0,5 g.L ⁻¹ de glutamina
0,1 g L ⁻¹ de asparagina	0,1 g.L ⁻¹ de asparagina	0,1 g.L ⁻¹ de asparagina

0,1 g L ⁻¹ de caseína hidrolisada 10 mg L ⁻¹ de tiamina 1mg L ⁻¹ de glicina 100 mg L ⁻¹ Myo-inositol 1 mg L ⁻¹ de ácido ascórbico 0,1 g L ⁻¹ de arginina	0,1 g.L ⁻¹ de caseína hidrolisada 10 mg.L ⁻¹ de tiamina 1mg.L ⁻¹ de glicina 100 mg.L ⁻¹ Myo-inositol 1mg.L ⁻¹ de ácido ascórbico 0,1 g.L ⁻¹ de arginina	0,1 g.L ⁻¹ de caseína hidrolisada 10 mg.L ⁻¹ de tiamina 1mg.L ⁻¹ de glicina 100 mg.L ⁻¹ Myo-inositol 1mg.L ⁻¹ de ácido ascórbico 0,1 g.L ⁻¹ de arginina
M4	M5	M6
- 5 µM de 2,4-D - - 20 g.L ⁻¹ de sacarose 0,5 g.L ⁻¹ de glutamina 0,1 g.L ⁻¹ de asparagina 0,1 g.L ⁻¹ de caseína hidrolisada 10 mg.L ⁻¹ de tiamina 1mg.L ⁻¹ de glicina 100 mg.L ⁻¹ Myo-inositol 1mg.L ⁻¹ de ácido ascórbico 0,1 g.L ⁻¹ de arginina	- 5 µM de 2,4-D - 4,92 µM AIB 20 g.L ⁻¹ de sacarose 0,5 g.L ⁻¹ de glutamina 0,1 g.L ⁻¹ de asparagina 0,1 g.L ⁻¹ de caseína hidrolisada 10 mg.L ⁻¹ de tiamina 1mg.L ⁻¹ de glicina 100 mg.L ⁻¹ Myo-inositol 1mg.L ⁻¹ de ácido ascórbico 0,1 g.L ⁻¹ de arginina	- 5 µM de 2,4-D 0,1 mg.L ⁻¹ ANA - 20 g.L ⁻¹ de sacarose 0,5 g.L ⁻¹ de glutamina 0,1 g.L ⁻¹ de asparagina 0,1 g.L ⁻¹ de caseína hidrolisada 10 mg.L ⁻¹ de tiamina 1mg.L ⁻¹ de glicina 100 mg.L ⁻¹ Myo-inositol 1mg.L ⁻¹ de ácido ascórbico 0,1 g.L ⁻¹ de arginina

Com o objetivo de otimizar o protocolo e melhorar a produção dos setores embriogênicos a partir de linhagens calogênicas provenientes de folhas jovens e de inflorescências imaturas, dois experimentos distintos foram estabelecidos.

Experimento 1: Efeito do meio de cultura e da combinação de diferentes auxinas na multiplicação de agregados celulares e células em suspensão de linhagens calogênicas oriundas de folhas jovens de *Euterpe precatoria* Mart.

Neste experimento, avaliou-se o crescimento em volume das linhagens calogênicas oriundas de tecido de folhas jovens, conforme o tipo de meio utilizado (Tabela 2)..

Tabela 2. Representação da disposição dos materiais (linhagens calogênicas) provenientes de tecidos foliares jovens (palmito – folhas aclorofiladas e não expandidas), conforme o meio de cultivo utilizado para o estabelecimento e multiplicação.

Origem	Designação da linhagem	Meio
Região apical (Indução a 450 µM PIC)	LT1	M4
Região mediana (Indução a 900 PIC µM)	LT2	M6
Região mediana (Indução a 900 PIC µM)	LT3	M5
Região apical (Indução a 450 µM PIC)	LT4	M1
Região apical (Indução a 450 µM PIC)	LT5	M3

Região apical (Indução a 450 µM PIC)	LT6	M2
--------------------------------------	-----	----

Embora os materiais possam ter o mesmo tratamento indutivo, estes estavam sob manutenção, podendo ter idades distintas e cultivos prévios em meios diferentes. Assim, cada origem foi considerada uma linhagem diferente.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (6 x 6 x 5), seis meios de cultivo x seis linhagens calogênicas x cinco tempos de avaliação, sendo cada tratamento representado por oito repetições. Em cada repetição, foi inoculado 0,5 mL de calo.

Experimento 2: Efeito do meio de cultura e da combinação de diferentes auxinas na multiplicação de agregados celulares e células em suspensão de linhagens calogênicas oriundas de inflorescências imaturas *Euterpe precatoria* Mart.

Neste experimento, avaliou-se o crescimento em volume das linhagens oriundas de inflorescências imaturas, conforme o tipo de meio descritos na tabela a seguir.

Tabela 3. Representação da disposição dos materiais (linhagens calogênicas) provenientes de inflorescências imaturas de *Euterpe precatoria* conforme o meio de cultivo utilizado para o estabelecimento e multiplicação.

Origem	Designação da linhagem	Meio
Indução a 450 µM PIC	LT7	M4
Indução a 450 µM PIC	LT8	M6
Indução a 450 µM PIC	LT9	M5
Indução a 450 µM 2,4-D	LT10	M1
Indução a 450 µM 2,4-D	LT11	M2
Indução a 450 µM 2,4-D	LT12	M3

Adotou-se a mesma metodologia aplicada para o experimento 1, considerando-se cada origem uma linhagem calogênica distinta.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (6 x 6 x 5), seis meios de cultivo x seis linhagens calogênicas x cinco tempos de avaliação, com oito frascos por linhagem. Cada frasco representando uma unidade experimental, onde foram inoculados 0,500 mL de solução contendo células/agregados celulares.

Para ambos os experimentos, a homogeneização das culturas foi realizada conforme a ilustração abaixo.

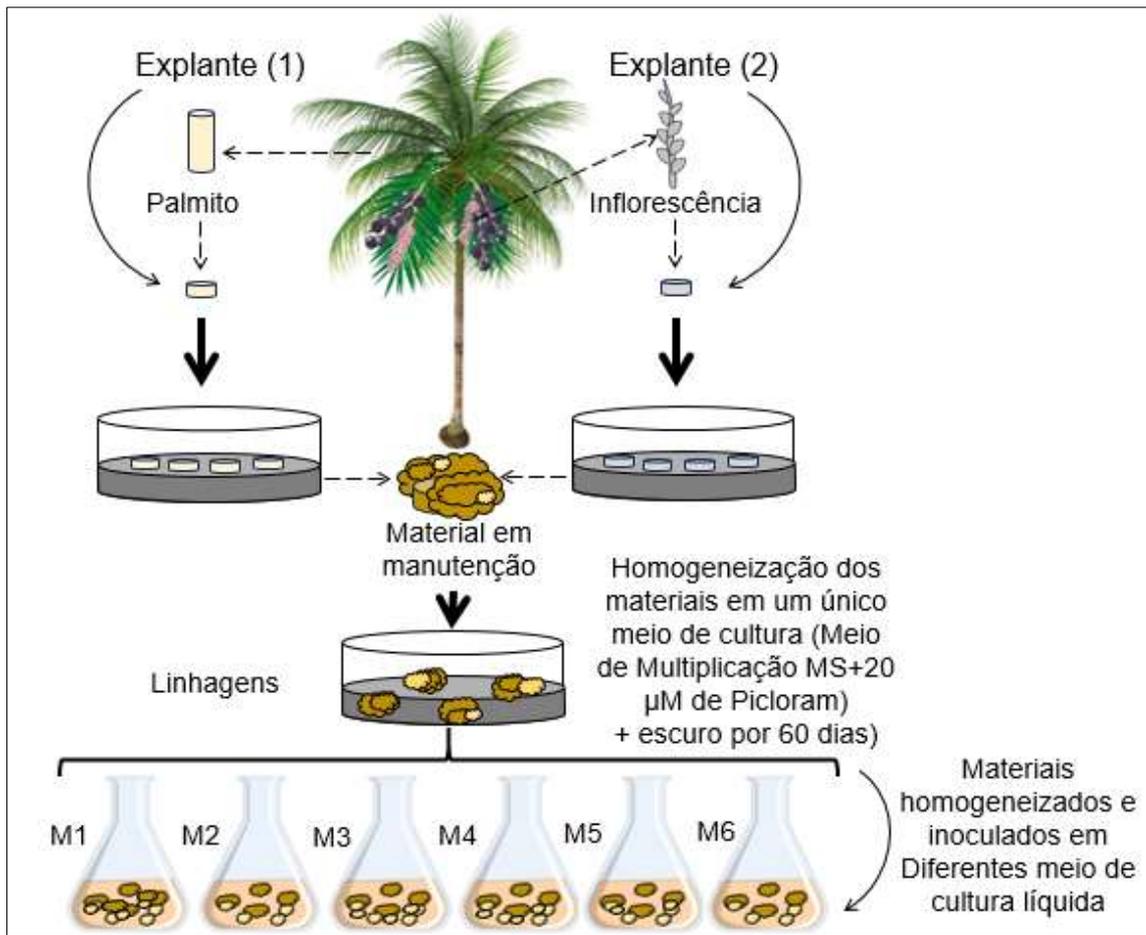


Figura 2. Esquema ilustrativo da indução de calos a partir de tecidos foliares e inflorescências de *E. precatória* manutenção dos calos obtidos em meio semissólido e estabelecimento e multiplicação de agregados celulares em suspensão, em diferentes formulações de meios (M1-M6).

Ainda para ambos os experimentos, seguiram-se as etapas abaixo no que se refere às condições de cultivo, avaliação das variáveis de crescimento (taxa de crescimento, densidade, tempo de dobramento de peso, coeficiente de correlação de Pearson, modelagem de Gompertz, parâmetros cinéticos, matriz de correlação Pearson das linhagens entre cada período de cultivo, matriz de crescimento) e realização das análises anatômicas e estatística dos dados.

Condições de cultivo

Em ambos os experimentos, após a inoculação, as linhagens foram mantidas em repouso em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas tubulares tipo Led (Philips, mod. 920008431). Nessas mesmas condições, após o repouso, os frascos foram transferidos para agitadores orbitais do tipo

industrial a 100 rpm (Figura 2B). Foram realizados subcultivos a cada 45 dias, ao longo de seis meses. Somente após os 45 dias iniciais, foram adicionados 10 mL de um meio novo em cada frasco. A partir do segundo subcultivo, foram retirados 15 mL do meio antigo, e, em seguida, foram adicionados mais 15 mL de meio novo.

Avaliação do crescimento

A cada subcultivo, o Volume Celular Sedimentado (VCS) foi verificado. Para tanto, o material vegetal dos frascos foi transferido para tubos *Falcon* graduados (Figura 3E), conforme Monteiro et al. (2018), em câmara de fluxo laminar. Os tubos foram mantidos em repouso por 30 minutos. Após esse período, verificou-se o volume sedimentado, repetindo-se o procedimento nas demais leituras.

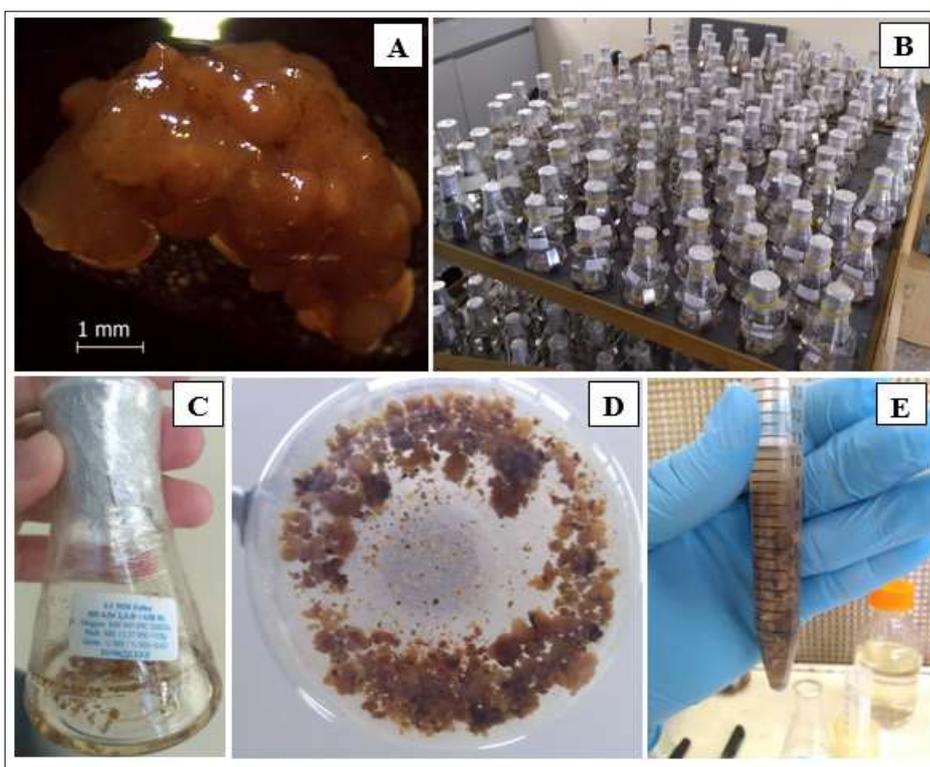


Figura 3. Aspectos gerais do estabelecimento e do cultivo de células e agregados celulares de *Euterpe precatoria* Mart. em meio líquido. **A.** Aspecto morfológico do tipo de calo (oriundo de explantes foliares) utilizado para o estabelecimento em meio líquido; **B.** Linhagens postas em agitador automático a 100 rpm, marcadas com ligas amarelas; **C-D.** Linhagens estabelecidas e multiplicando em meio líquido; **E.** Agregados celulares em tubo *Falcon* (ilustração antes da sedimentação).

Taxa de crescimento

A determinação do crescimento das linhagens embriogênicas foi realizada de acordo com as fórmulas a seguir:

Taxa de Crescimento Médio (*TCM*):

$$TCM = \frac{\ln MF - \ln MI}{t} \quad (1)$$

Em que, *MF* = Massa final (g); *MI* = Massa inicial (g); *t* = tempo de cultivo.

Modelagem de Gompertz

Utilizou-se o modelo matemático de Gompertz para verificar a curva de crescimento não linear ou sigmoide (crescimento em forma de S), usando o software GraphPad Prism 9.0, aplicando-se uma análise de regressão não linear, conforme o modelo abaixo:

$$Y = a * e^{(-be^{-c*t})} \quad (2)$$

Em que: *Y* = variável dependente (g); *t* = tempo de cultivo (dias); “*a*”, “*b*” e “*c*” = constantes de integração;

Uma vez obtidas as constantes, determinaram-se os parâmetros cinéticos de crescimento das linhagens. Os dados são apresentados como média ± erro padrão.

Parâmetros cinéticos

μ_{max} = velocidade máxima de crescimento específico das células (d^{-1}), estimada utilizando a fórmula abaixo:

$$\mu_{max} = a * c \quad (3)$$

λ = tempo da fase lag;

$$\lambda = \frac{b - 1}{c} \quad (4)$$

Classes de volume por Sturges

As amplitudes de classes foram calculadas via método estatístico de Sturges (STURGES, 1926). Esse método determina o número de classes por meio da seguinte fórmula:

$$nc = 1 + 3,3 \log(N) \quad (5)$$

nc = número de classes;

N = número de indivíduos medidos.

Além disso, a amplitude de classe (*Ac*) foi determinada pela seguinte equação:

$$Ac = (\text{máximo} - \text{mínimo}) / (nc - 1) \quad (6)$$

Onde:

máximo = maior volume encontrado;

mínimo = menor volume encontrado.

Análise anatômica

As análises anatômicas das amostras de agregados celulares estabelecidas e multiplicadas nos diferentes meios de suspensão foram obtidas conforme Silva-Cardoso et al. (2020). Para isso, coletaram-se amostras aos 100 dias de cultivo, as quais foram submetidas aos procedimentos de fixação, desidratação e emblocamento do material vegetal. Em micrótomo rotativo manual (Leica®, RM212RT), seccionou-se as amostras (3-10 µm). Aas secções transversais e longitudinais foram então distendidas e postas em lâminas microscópicas em placa aquecedora a 40 °C. Em seguida, as amostras foram coradas com Azul de Toluidina (0,5%) para caracterização estrutural (O'BRIEN; FEDER; MCCYLLY, 1964). As imagens para análise das estruturas foram obtidas via microscópio Leica DM 750 e programa Leica Application Suite EZ.

Análise estatística dos dados

O crescimento em volume foi avaliado utilizando-se oito repetições por tratamento, respectivamente. Para identificar as condições mais adequadas de crescimento em volume em meio líquido, os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA). As médias foram comparadas usando pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), usando software SISVAR, versão 5.6 FERREIRA (2019). Realizou-se estatística multivariada por meio da análise dos componentes principais (PCA), para determinar as relações entre o crescimento durante o tempo de cultivo e o tipo de meio utilizado. Para essa etapa, usou-se o pacote “vegan”, do software R versão 4.2.1. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão.

RESULTADOS

Experimento 1: Efeito do meio de cultura e da combinação de diferentes auxinas na multiplicação de agregados celulares e células em suspensão de linhagens calogênicas oriundas de folhas jovens de *Euterpe precatoria* Mart.

Conforme mencionado, as linhagens permaneceram em repouso após inoculação em meio líquido por oito dias. Nesse período, não foi observada contaminação ou oxidação nas culturas. Após o repouso, mesmo quando foram submetidas à agitação, as linhagens permaneceram

estáveis no meio, livres de escurecimento e contaminação. Ao final dos 30 de cultivo, os materiais continuaram em estabilidade, sem contaminação e sem oxidação, porém morfológicamente já era possível notar novas estruturas presentes no meio. Aos 45 dias, observou-se que as linhagens cultivadas nos novos meios de suspensão (meio básico de MS com diferentes combinações de auxinas) foram estabelecidas com sucesso e já apresentavam multiplicação evidente.

Os novos meios utilizados mantiveram a sobrevivência de 100% das linhagens. Conforme às análises estatísticas, diferenças significativas foram constatadas para o tipo de meio de cultivo e o tempo de cultivo, conforme verificado na Tabela 4.

Tabela 4. Desdobramento das médias de incremento de volume (mL) de agregados celulares oriundos de tecidos foliares de *E. precatoria* Mart. cultivados em diferentes meios de cultivo líquidos, em função da linhagem celular em cada tempo de cultivo, pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. L = Linhagem; MC = meio de cultivo.

L*MC	Período				Equação da regressão	R ²
	45	90	135	180		
LT4 * M1	2,93 bC	4,68 bB	7,75 aA	4,43 aB	$y = -0,0003x^2 + 0,0814x + 0,1429$	0,91
LT6 * M2	2,43 bB	4,12 aA	3,56 cA	4,87 aA	$y = -0,0002x^2 + 0,0409x + 0,4893$	0,90
LT5 * M3	4,43 aB	6,81 bA	5,75 bA	6,06 aA	$y = -0,0003x^2 + 0,0713x + 0,8714$	0,90
LT1 * M4	2,56 bC	4,75 bB	6,5 bA	4,50 aB	$y = -0,0004x^2 + 0,0929x + 0,0696$	0,83
LT3 * M5	4,25 aA	4,87 bA	4,50 cA	4,62 aA	$y = -0,0004x^2 + 0,0955x + 0,6982$	0,94
LT2 * M6	1,81 bA	3,12 bA	2,37 dA	2,18 bA	$y = -0,0001x^2 + 0,0442x + 0,625$	0,91

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância. Nota: M1 =PIC; M2 = PIC+AIB; M3 = PIC+ANA; M4=2,4-D; M5=2,4-D+AIB; e M6=2,4-D+ANA.

Com base na Tabela 4, os volumes diferiram significativamente em todos os aspectos (linhagem, tempo de cultivo e meio de cultivo) entre os componentes da regressão polinomial do crescimento celular em volume ao longo do tempo. As mensurações de volume possibilitaram verificar os resultados satisfatórios quanto ao incremento de volume celular quantificado, uma vez que apresentaram crescimento superiores aos evidenciados no protocolo inicial da espécie por meio da pesagem de incremento de massa (g), superando os resultados ali adquiridos. Especificamente a linhagem LT5 destacou-se com alto volume de agregados e células em suspensão quando cultivada na formulação M3, após 180 dias de cultivo. Resultados expressivos também foram verificados para as linhagens LT4 e LT3, quando cultivada em meio M1 (PIC) e M5 (2,4-D+AIB), respectivamente, após 135 dias de cultivo. Estudos relacionados

com essa combinação de auxinas também devem ser indicadas para utilização futuras no cultivo *in vitro* da espécie. Esse fato também é confirmado pelas imagens morfológicas dos calos.

Os resultados do crescimento em volume são muito parecidos, inclusive os resultados da estatística. Esse fato indica uma elevada correlação entre o crescimento de linhagens com as auxinas Picloram e 2,4-D no meio líquido. Portanto, linhagens de *E. precatoria* podem ser cultivados em meios de suspensão contendo qualquer uma dessas auxinas, na concentração de 5 μ M.

Pela semelhança em alguns resultados, averiguou-se, por meio da análise dos componentes principais, similaridade entre as linhagens (Figura 4).

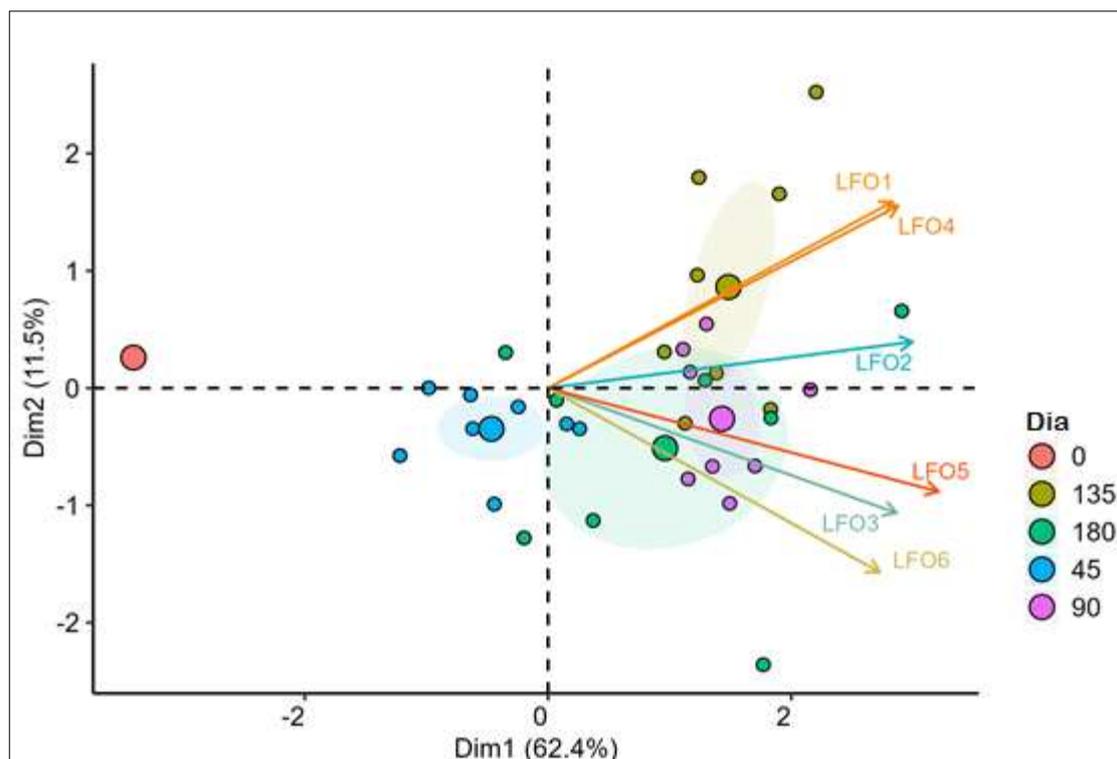


Figura 4. Análise dos componentes principais (PCA) do crescimento em volume em diferentes linhagens embriogênicas de *Euterpe precatoria* Mart. (açai-solteiro) ao longo do tempo de cultivo em diferentes meios de suspensão. R= (74,12%).

Nota: LFO1 = LT1; LFO2 = LT2; LFO3 = LT3; LFO4 = LT4; LFO5 = LT5; LFO6 = LT6;

Os dois componentes principais explicaram 74,12% da variação total dos dados, sendo, portanto, o PCA bem ajustado, que permitiu observar a tendência no desenvolvimento dos calos em suspensão. PC1 representou 62,4% da relação, com separação das linhagens em clusters.

O PCA confirma os dados apresentados na tabela de desdobramento das médias (Tabela 4). O gráfico subsidia e mostra a alta correlação entre as linhagens LT1, representado pelo vetor LFO1 e pela linhagem LT4, representado pelo vetor LFO1, formando um grupo específico.

Esses resultados indicam um comportamento de crescimento diferente dessas duas linhagens em relação às demais em meio de suspensão, que é confirmado pelas características morfológicas.

A correlação positiva é tão elevada entre essas duas linhagens que os vetores quase sobrepõem-se. Para tanto, um leve desempenho da linhagem cultivada no meio contendo auxina Picloram (LT4*M1) foi verificado em relação ao meio contendo auxina 2,4-D (LT1 * M4). Dessa forma, o gráfico de PCA evidencia o desempenho eficiente dos novos meios de cultura associado tanto com a auxina Picloram quanto com a auxina 2,4-D no cultivo em suspensão de *E. precatória*.

Os vetores LFO3, LFO5 e LFO6 representam respectivamente as linhagens LT3, LT5 e LT6, no qual encontram-se agrupados nos dois quadrantes do lado direito, com correlação positiva entre as linhagens. O agrupamento dos vetores possui proximidade e angulações quase que equidistantes. Portanto, as amostras agrupadas demonstram comportamentos de crescimento semelhantes, conforme os dados da Tabela 4. Para tanto, as similaridades são maiores entre as linhagens LT3 e LT5.

Outro fato que o gráfico subsidia na Tabela 4, são os componentes principais em volume da linhagem LT2, representada pelo vetor LFO2, com menores níveis de volume. O isolamento do vetor com grande angulação indica que a linhagem apresentou baixa correlação com as demais. Para tanto, esse isolamento também evidencia os menores níveis alcançados pela linhagem no meio M6 (2,4-D+ANA). Essa linhagem (LT2) ficou significativamente fora do padrão geral apresentado pelas demais linhagens no crescimento em volume.

Como alguns comportamentos foram muito similares, decidiu-se aplicar da fórmula de Sturges (1926). Por essa estimativa é possível garantir consistência das análises e complementar a comparação entre os resultados (Figura 5).

Como o número de frascos utilizado na pesquisa foi representativo, pôde-se estimar a distribuição dos volumes aferidos em histogramas, com classes determinadas pela fórmula de Sturges (1926). Dessa forma, foi possível identificar condições incomuns ou eventos significativos no crescimento celular em volume, como são visivelmente identificadas classes muito amplas, regulares ou baixas. De maneira geral, apenas a linhagem LT3 apresentou seis classes de volume. As demais foram compostas por cinco classes (Figura 5).

A linhagens LT1 e LT4 apresentaram uma distribuição de volume mais similar entre as classes. A distribuição das frequências observadas dos volumes dos agregados nessas duas linhagens foi mais regular, havendo um padrão nas tendências de crescimento das mesmas. Na linhagem LT1 (M4- 2,4-D), houve predominância de volume na segunda classe (entre 2 e 4 mL

de volume), totalizando 12 observações. Na linhagem LT4 (M1 - PIC) a predominância ocorreu na terceira classe de volume (entre 4,1 e 6,0 mL de volume), com 11 observações verificadas (Figura 5).

A soma entre a segunda e a terceira classe de volume na LT1 totalizam 18 observações, entre 2 e 6 mL de volume. Já na linhagem LT4, o número de observações equivalente entre 2,0 e 6,0 de mL de volume chegam 20. Esse resultado foi o fator determinante para leve superioridade da linhagem LT4 em relação à linhagem LT1 (Figura 5).

Assim, com base nos dados obtidos, observa-se pela taxa média de crescimento dos calos e agregados celulares em suspensão que a dinâmica de crescimento variou entre as linhagens ao longo dos 180 dias de cultivo (Figura 5). Com base nessa figura têm-se as percepções sobre o comportamento crescimento celular entre as linhagens.

De maneira geral, a linhagem LT5 (M3 PIC+ANA) apresentou maiores taxas de crescimento ao longo do cultivo, com exceção do valor observado aos 135 dias de cultivo. Com crescimento expressivo, essa linhagem alcançou níveis próximos de 800% da TCM aos 45 dias de cultivo. Aos 90 dias, essa linhagem ultrapassou 1200% de TCM, estabilizando nos períodos seguintes, mantendo-se aproximadamente acima de 1000% de TCM (Figura 6).

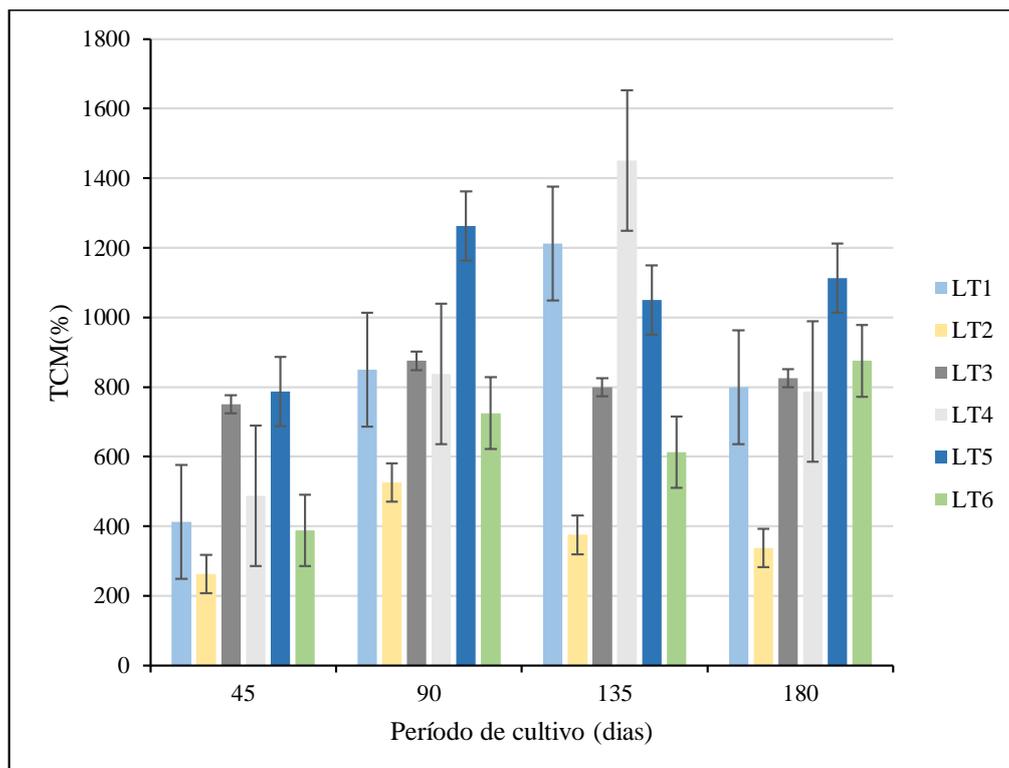


Figura 6. Taxa média do crescimento (% TCM) de calos e agregados celulares em suspensão de materiais somáticos foliares de *Euterpe precatoria* Mart. ao longo dos 180 dias de inoculação. Barras representam o erro padrão médio. Nota 1: LT1*M4; LT2M6; LT3*M5; LT4*M1; LT5*M3; LT6*M2
Nota 2: M1 =PIC; M2 = PIC+AIB; M3 = PIC+ANA; M4=2,4-D; M5=2,4-D+AIB; e M6=2,4-D+ANA.

A linhagem LT4, alcançou a maior TCM aos 135 dias de cultivo, atingindo um percentual acima de 1400% de calos produzidos por essa linhagem. A razão deste resultado ocorreu pelo fato de que foi nesse período que aconteceu os maiores incremento de volume entre 8,1 e 10,0 mL de volume. Já aos 90 e 180 dias, essa linhagem manteve-se com uma TCM em 800%.

Outra linhagem com crescimento significativo foi a LT1, com TCM média acima dos 800% aos 90 dias e ápice de crescimento aos 135 dias, atingindo 1200% de crescimento em volume celular. Aos 180 dias, essa linhagem manteve uma TCM a 800% de crescimento em volume celular.

De maneira geral, ainda que a linhagem LT3 não tenha alcançado os níveis de TCM das LT1, LT5 e LT4, verifica-se que esta apresenta uma TCM média de 800% ao longo do experimento, sendo possível verificar a representatividade da homogeneidade na multiplicação de setores embriogênicos nessa linhagem. Esse resultado indica que esse tratamento tem efeito positivo para potencializar o crescimento e melhorar as condições de cultivo.

A linhagem LT6, manteve TCM variável ao longo tempo. Porém os resultados obtidos por essa linhagem também apresentaram TCM satisfatórios, sendo superiores a 700, 600 e 800 %, aos 90, 135 e 180 dias de incubação.

Cinética de crescimento e aplicação de modelo matemático de Gompertz

As curvas ajustadas pelo modelo Gompertz (Figura 7) podem ser consideradas adequadas, uma vez que os valores de R^2 encontrados descrevem mais de 70% da cinética de crescimento das linhagens (Tabela 5).

Tabela 5. Constantes do modelo de Gompertz ($Y = a * e^{(-be^{-c*t})}$) e coeficiente correlação das suspensões de linhagens oriundas de tecidos somáticos de folhas imaturas de *Euterpe precatoria* Mart. cultivadas em diferentes meios de suspensão celular em função da linhagem celular durante 180 dias de cultivo.

os	Parâmetr	Linhagens genéticas					
		LT1 (2,4- D)	LT2 (2,4- D+ANA)	LT3 (2,4- D+AIB)	LT4 (PIC)	LT5 (PIC+AN A)	(LT6 (PIC+AI B)
a		1,782988	1,233616	1,706083	1,845515	1,94077	1,60922
b		1,525096	1,137251	1,437132	1,543265	1,575334	1,378537
c		0,034781	0,044238	0,083779	0,037135	0,055137	0,352606
R ² (%)		87	84	99	76	96	83

Nota: M1 =PIC; M2 = PIC+AIB; M3 = PIC+ANA; M4=2,4-D; M5=2,4-D+AIB; e M6=2,4-D+ANA.

O modelo de Gompertz permitiu visualizar dinâmica de crescimento das linhagens em função do meio de cultivo ao longo dos 109 dias de cultivo (Figura 7). A linhagem LT1 mostrou uma curva de crescimento com característica sigmoide (Fig. 7). Para essa linhagem, as culturas permaneceram por 15,1 dias na fase lag, antes de entrarem na fase de crescimento exponencial e duraram até o 45º dia. A taxa de crescimento máxima específica (μ_{max}) foi de 2,72 d⁻¹ com um tempo de duplicação (G) de 0,25 dias até que as culturas atingissem a fase estacionária (Tabela 6). Com base na curva, observando o ponto de estabilidade, recomenda-se que entre os 90 e 135 dias de cultivo, na manutenção do meio seja realizada a transferência dos calos para plaqueamento.

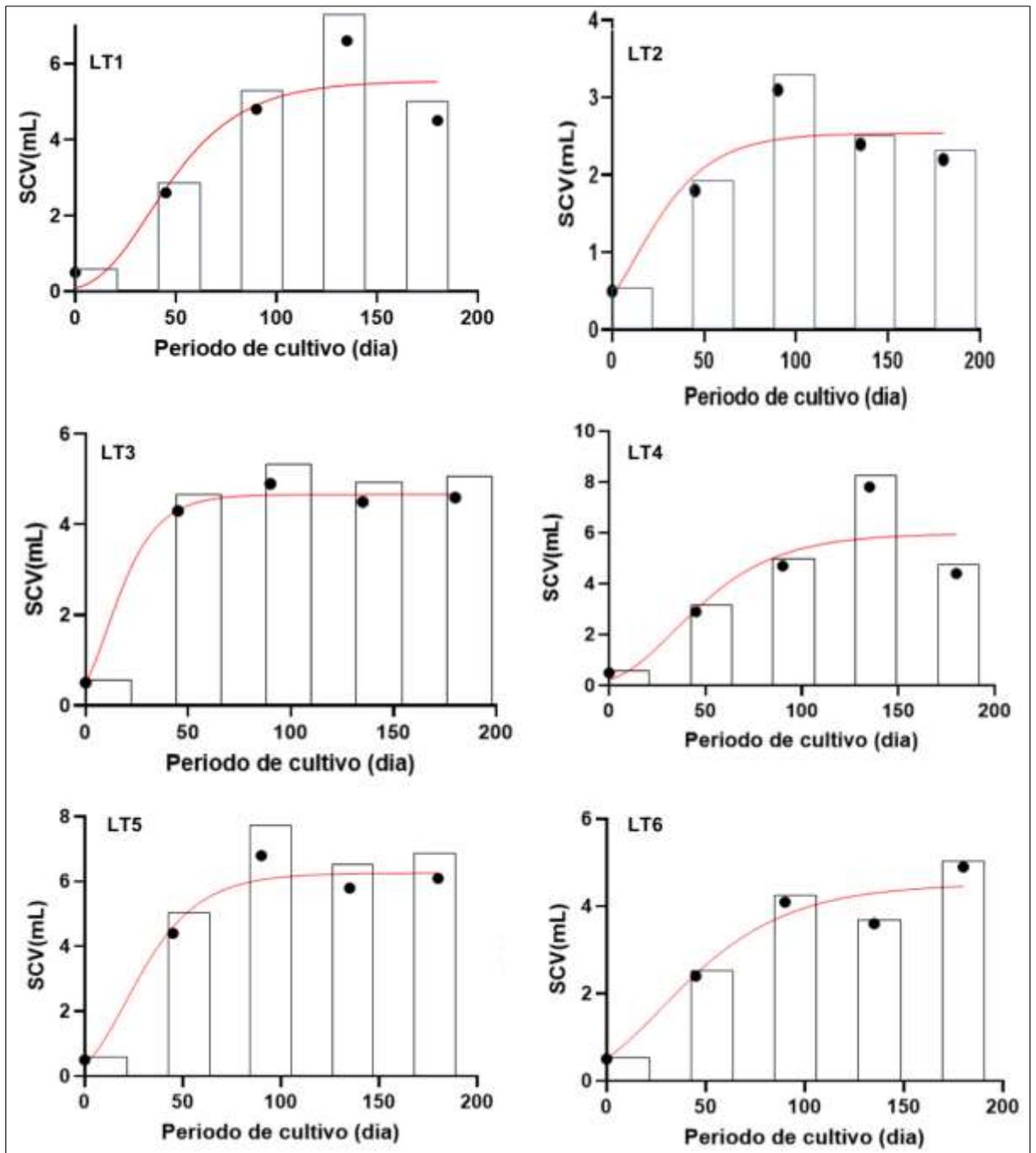


Figura 7: Curvas de crescimento dos calos e agregados celulares em suspensão de linhagens oriundas de tecidos somáticos de folhas imaturas de *Euterpe precatoria* Mart. cultivadas em diferentes meios de cultivo, ajustadas ao modelo de Gompertz ($Y = a * e^{(-be^{-c*t})}$) durante 180 dias de cultivo. Nota 1: LT1*M4; LT2M6; LT3*M5; LT4*M1; LT5*M3; LT6*M2. Nota 2: M1 =PIC; M2 = PIC+AIB; M3 = PIC+ANA; M4=2,4-D; M5=2,4-D+AIB; e M6=2,4-D+ANA.

Na linhagem LT2, a curva obteve uma tendência sigmoide mesmo característica que a linhagem LT1. O menor tempo da fase lag (3,1 dias) pode ter influenciado essa dinâmica. Para tanto, nota-se uma tendência de crescimento de forma sigmoide antes de entrarem na fase

estacionária (Fig. 7). A taxa de crescimento específico máximo (μ_{max}) foi de $0,05d^{-1}$ com um tempo de duplicação (G) de 12 dias até que as culturas (Tabela 6). Com base na curva, observando o ponto de estabilidade, recomenda-se que entre os 75 e 100 dias de cultivo, na manutenção do meio seja realizada a transferência dos calos para plaqueamento.

Na linhagem LT3, as culturas permaneceram em média por 12,57 dias na fase lag, antes de entrarem na fase de crescimento exponencial e linear até os 75 dias, onde entrou em modo estacionário até o final do experimento. A curva mais constante para os incrementos de volume, ocorreu pela existência de um padrão de médias uniformes ao longo do tempo, com pontos coincidindo ou muito próximos da curva.

Nota-se que a fase estacionária foi estabelecida logo aos 75 dias, sendo possível verificar a tendência de estabilização já aos 45 dias (Fig.7). Com base na curva, observando o ponto de estabilidade, recomenda-se que entre os 45 e 90 dias de cultivo, na manutenção do meio seja realizada a transferência dos calos para plaqueamento (Fig.7). Com relação à cinética de crescimento, a taxa de crescimento específico máximo (μ_{max}) na linhagem LT3 foi de $0,14d^{-1}$, com um tempo de duplicação (G) de 4,85 dias (Tabela 6).

Para linhagem LT4, o padrão sigmoide é verificado. As culturas permaneceram em média por 14,63 dias na fase lag antes de entrarem na fase de crescimento exponencial, por volta dos 45 dias, e na fase linear, por volta dos 125 dias, entrando em modo estacionário até o final do experimento (Fig. 7). A taxa de crescimento específico máximo (μ_{max}) foi de $0,07 d^{-1}$ com um tempo de duplicação (G) foi de 0,38 dias (Tabela 6). Com base na curva, recomenda-se que entre os 90 e 100 dias de cultivo, seja realizada a transferência dos calos para plaqueamento.

Na linhagem LT5, também se verifica a tendência sigmoide das curvas. Nessa linhagem, as culturas permaneceram em média por 10,43 dias na fase lag antes de entrarem na fase de crescimento exponencial, que durou aproximadamente 25 dias, e linear, que perpetuou até os 75 dias, onde entrou em modo estacionário até o final do experimento (Fig. 7). A taxa de crescimento específico máximo (μ_{max}) foi de $0,11 d^{-1}$ com um tempo de duplicação (G) foi de 6,48 dias (Tabela 6). Com base na curva, recomenda-se que entre os 75 e 90 dias de cultivo, seja realizada a transferência dos calos para plaqueamento.

Na linhagem LT6, as culturas permaneceram em média por 10,43 dias na fase lag, antes de entrarem na fase de crescimento exponencial que durou aproximadamente 25 dias e linear que perpetuou por até os 75 dias, onde entrou em modo estacionário até o final do experimento. Com base na curva, recomenda-se aos 90 dias de cultivo a transferência dos calos para plaqueamento.

As curvas representadas pelo modelo de Gompertz se ajustaram bem aos dados representados pelas linhagens, embora note-se a presença de alguns pontos fora da curva. Conforme observado nas figuras, os resultados da cinética de crescimento ao longo dos 180 dias de cultivo podem ser observados na tabela (Tabela 5). Pode-se verificar os diferentes períodos da fase lag λ (dia) nas linhagens, bem como a velocidade máxima de crescimento específico μ_{max} (d^{-1}) e o tempo de duplicação (Tabela 5 ou 6).

Tabela 6. Parâmetros Cinéticos das suspensões de linhagens genéticas oriundas de material somático de folhas imaturas de *Euterpe precatoria* Mart. cultivadas em diferentes meios de cultivo ao longo de 180 dias de incubação.

Parâmetros	Cultivos em Suspensão de Folha					
	LT1 (2,4-D)	LT2 (2,4-D+ANA)	LT3 (2,4-D+AIB)	LT4 (PIC)	LT5 (PIC+ANA)	LT6 (PIC+AIB)
μ_{max} (d^{-1})	2,72	0,05	0,14	0,07	0,11	0,57
λ (dia)	15,10	3,10	12,57	14,63	10,43	1,07
G (dia)	0,25	12,70	4,85	0,38	6,48	1,22

Legenda: μ_{max} = velocidade máxima específica de crescimento. λ = tempo de fase lag (d). G = tempo de regeneração das células. R^2 = coeficiente de correlação.

Nota: M1 =PIC; M2 = PIC+AIB; M3 = PIC+ANA; M4=2,4-D; M5=2,4-D+AIB; e M6=2,4-D+ANA.

Caracterização do tamanho dos calos e agregados celulares em suspensão

Para uma melhor compreensão da morfologia de crescimento dos calos, verificou-se a presença de calos grandes ao longo do período de cultivo. Em quase todas as linhagens a presença de calos grandes foi maior aos 90 dias (Tabela 7).

Tabela 7. Porcentagem de formação de calos grandes das suspensões de linhagens genéticas oriundas de material somático de folhas imaturas de *Euterpe precatoria* Mart. cultivadas em diferentes meios ao longo de 180 dias de incubação.

Linhagens * Meio de cultivo	Período de Cultivo (dias) e ocorrência de calos grandes (%)			
	45	90	135	180
LT1 * M4	75	100	75	50
LT2 * M6	25	75	50	37,5
LT3 * M5	62,5	100	75	55
LT4 * M1	50	100	75	62,5
LT5 * M3	25	75	62,5	50
LT6 * M2	50	100	62,5	50

Nota: M1 =PIC; M2 = PIC+AIB; M3 = PIC+ANA; M4=2,4-D; M5=2,4-D+AIB; e M6=2,4-D+ANA.

No primeiro subcultivo, verifica-se que a linhagem LT1 obteve predominância em relação as demais linhagens quanto a porcentagem de ocorrência de calos grandes (75%). A linhagem LT3 foi a linhagem com a segunda maior incidência de calos grandes (62,5%).

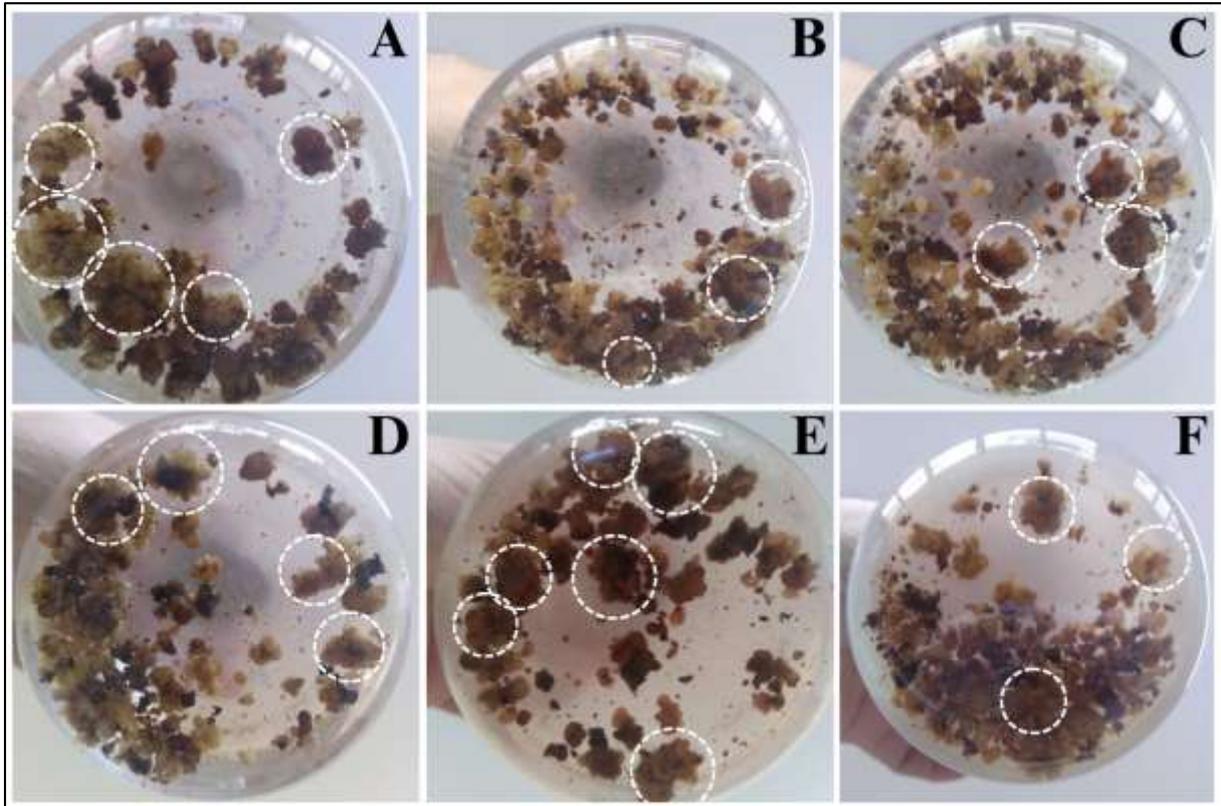


Figura 8. Aspectos morfológicos dos calos grandes verificados nas diferentes linhagens de folhas imaturas de *Euterpe precatoria* cultivadas em meio de suspensão. A- F círculos brancos sobre alguns calos considerados muito grandes, em diferentes linhagens de folhas imaturas aos 90 dias de cultivo.

Aos 90 dias, verificou-se que todas as parcelas das linhagens LT1, LT3, LT4 e LT6 apresentaram formação de calos grandes. Alguns desses calos apresentaram antocianinas, o que pode caracterizar etapa ideal para transferência de meio e mudança de etapa, nesse caso a diferenciação. Salienta-se que conforme a morfologia verificada, os calos podem chegar a mais de 100 dias de cultivo para realizar a transferência de meio e mudança de etapa.

A linhagem LT5 apresentou pequenas variações na porcentagem de calos grandes, com pico aos 90 dias, decrescendo ao longo dos demais períodos do experimento. A partir dos 135 dias de cultivo, todas as linhagens apresentam decréscimo na porcentagem de calos grandes.

Embora a linhagem cultivada no meio 2,4-D tenha apresentado resultados satisfatórios com multiplicação elevada, os calos originados dessa linhagem eram muito grandes e não

homogêneos. Os materiais oriundos de 2,4 D+AIB mantiveram a homogeneidade no tamanho dos calos, com coloração marrom, estes constituíam um excelente material em meio de suspensão.

Os materiais cultivados com meio PIC+ANA formaram excelentes linhagens em meio de suspensão. Embora tenham sido prejudicados pela oxidação (Tabela 7), os calos cultivados em meio PIC também apresentaram elevada multiplicação, sendo muitos casos no início do processo, com calos branquinhos e mudando com o passar do tempo.

Tabela 7. Porcentagem e grau de oxidação de linhagens oriundas de tecidos somáticos de folhas imaturas de *Euterpe precatoria* Mat. em diferentes meios de suspensão em função do tempo de cultivo.

MG x MC	Grau de oxidação por período de Cultivo (dias)									
	30	Grau	45	Grau	90	Grau	135	Grau	180	Grau
LT1 (2, 4-D)	0	-	25	+	25	++	75	+++	100	+++
LT2 (2,4 D+ANA)	0	-	100	+++	100	+++	100	+++	100	+++
LT3 (2,4 D+AIB)	0	-	25	+	25	+	20	+	10	+
LT4 (PIC)	0	-	37,5	+	100	+++	100	+++	100	+++
LT5 (PIC+ANA)	0	-	25	+	100	++	100	++	100	++
LT6 (PIC+AIB)	0	-	25	+	62,5	+	62,5	+	85	++

Nota: M1 =PIC; M2 = PIC+AIB; M3 = PIC+ANA; M4=2,4-D; M5=2,4-D+AIB; e M6=2,4-D+ANA.

As primeiras oxidações surgiram aos 45 dias após a inoculação, logo após a primeira manutenção no de meio de cultivo. Aos 45 dias, a linhagem LT2 (2,4-D+ANA) foi a única que apresentou elevado grau de oxidação, sendo que todas as parcelas constituintes desta linhagem tiveram incidência do processo oxidativo, permanecendo esse comportamento até o final do experimento (180 dias). Esse fato pode ter causado interferência na multiplicação dos calos.

Aos 90 dias, as linhagens LT2 (2,4-D ANA), LT4 (PIC), LT5 (PIC ANA), apresentaram 100% de oxidação. Isso implica que em todos os frascos havia a presença de calos oxidados, que também permaneceram recorrente nas demais avaliações. Apesar da presença da oxidação, algumas dessas linhagens não se limitavam na incidência da mesma para se multiplicar, sendo um fator superável que não constituiu impedimento para a multiplicação, como foi o caso das linhagens LT4 (PIC) e LT5 (PIC ANA).

A linhagem com menor porcentagem e grau de oxidação foi LT3 (2,4-D+AIB). Essa linhagem manteve-se sempre com uma coloração específica (tons de marrom que não se manifestava como oxidação, mas como uma característica inerente ao material genético) e multiplicação mais homogênea, tanto pela morfologia globular, por serem muito parecidos ou iguais pelo tom marrom de seus calos.

A homogeneidade na multiplicação dos calos como nessa linhagem não foi verificado nas demais. Outro aspecto importante foi a resistência da linhagem à oxidação nas trocas de meio de cultivo.

Outra linhagem que também apresentou baixo grau de oxidação nos calos em meio líquido foi a LT6 (PIC+AIB). Já na linhagem LT1 (2,4-D), a baixa porcentagem e grau de oxidação ocorreram até os 90 dias de cultivo, aumentando a porcentagem e o grau de oxidação gradativamente ao longo do tempo.

De modo geral, as linhagens cultivadas com ANA no meio de cultura foram as mais oxidadas, sobretudo, a partir dos 90 dias de cultivo. Contudo, logo após esse período depois da inoculação, a maioria das linhagens foram afetadas pela oxidação. Esse resultado deve ser melhor investigado para entender o porquê desse comportamento oxidativo logo após manutenção/troca do meio. Muito embora a contaminação em meio líquido seja mais favorável de ocorrer, houve contaminações somente após a troca de meio no período de 180 dias de cultivo. A linhagem afetada pela contaminação foi somente a LT2 (2,4-D+ANA = 12,5%).

Características anatômicas dos calos oriundos de folha imaturas cultivados em meio líquido

Conforme as secções anatômicas, os calos apresentaram características anatômicas distintas umas das outras (Figuras 9 a 11). A Figura 9A, B representa secções anatômicas dos materiais inoculados no meio M1 (5 M μ de Picloram), onde verifica-se o embrião somático totalmente definido (torpedo evidente) com vacúolos ocupando grande volume celular, protoderme e procâmbio (células alongadas evidentes). Observa-se ainda células vacuoladas com núcleos ausentes e presença de espaços intercelulares (Figura 9B).

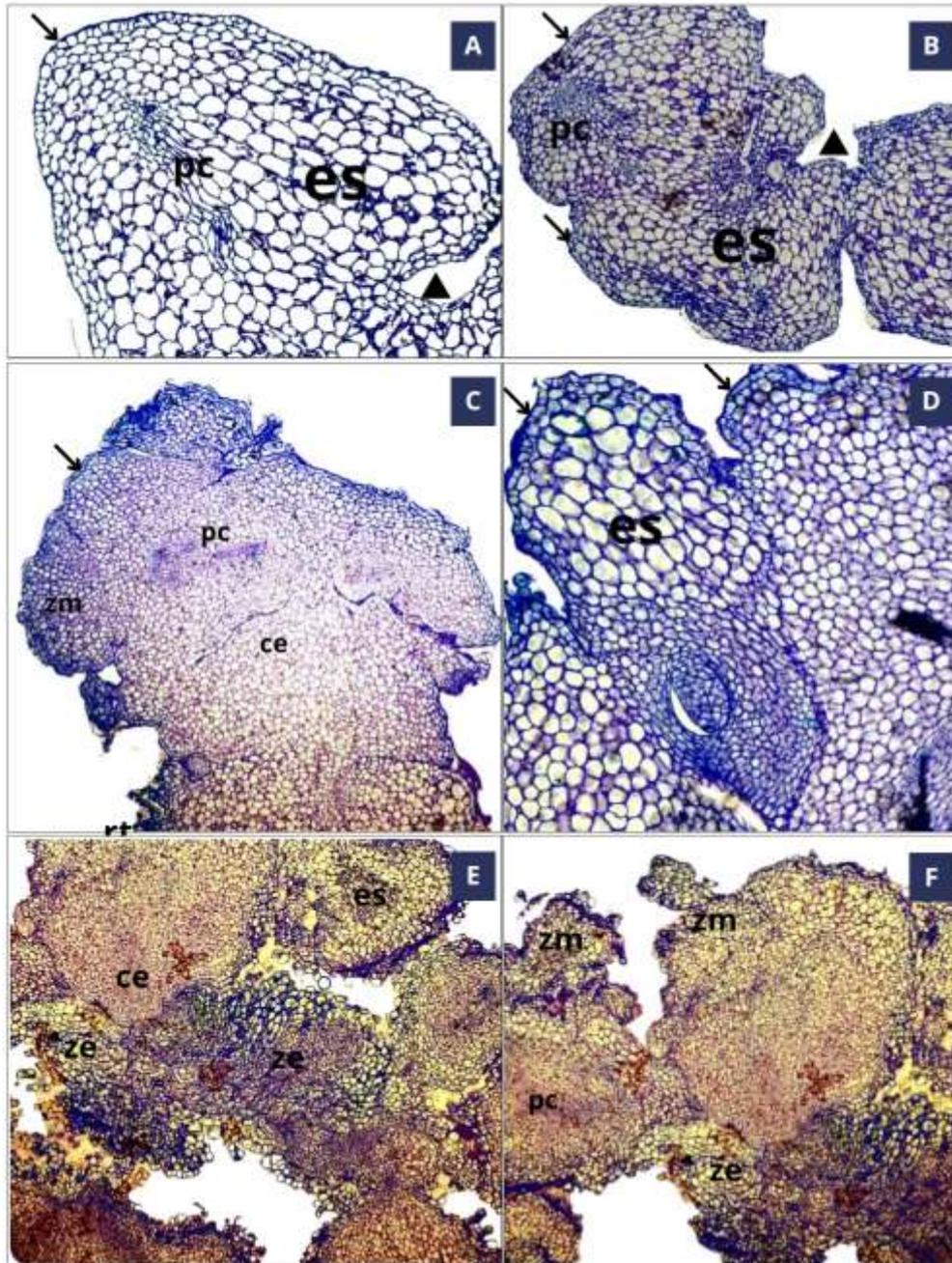


Figura 9. Secções anatômicas de agregados celulares oriundas de folhas imaturas de *Euterpe precatoria* Mart. (açai-solteiro) após 100 dias de cultivo em meio líquido com diferentes composições. A: secção anatômica de embrião somático definido, com estrutura similar ao suspensor (triângulo), notar a protoderme (seta) e procâmbio, cultivado em meio M1. C:calo embriogênico; notar diferentes zonas celulares e procâmbio; D: secção anatômica de possível embrião somático, cultivadas no meio M3 (Picloram + ANA). E-F: calo embriogênico; notar diferentes zonas celulares, cultivadas no meio M2 (Picloram + AIB). A-B = 20x; C=10x; D=20x; E-F = 4x.

Na Figura 9, letras E e F, de acordo com as análises das seções anatômicas, os calos exibem uma zona meristemática composta por células menores, com ausência de vacúolos e espaços intercelulares. Além disso, no interior do calo pode haver uma zona parenquimática, constituída por células com vacúolos que ocupavam grande parte do volume celular. Identificaram-se zonas de ruptura de tecido celular que podem estar associadas ao crescimento.

Calos com grande volume celular também foram observados no meio M3, apresentando setores procambiais e zona meristemática. A letra “D” da Figura 8 evidencia uma possível formação de embrião somático, com zona embriogênica no interior do calo.

Segundo as seções anatômicas, os calos embriogênicos cultivados em meio líquido contendo 5 μ M de 2,4-D mostraram uma predominância de características meristemáticas quando comparadas com meio contendo Picloram. Essas incluíam vacúolos pequenos e a ausência de espaços entre as células (Fig. 10).

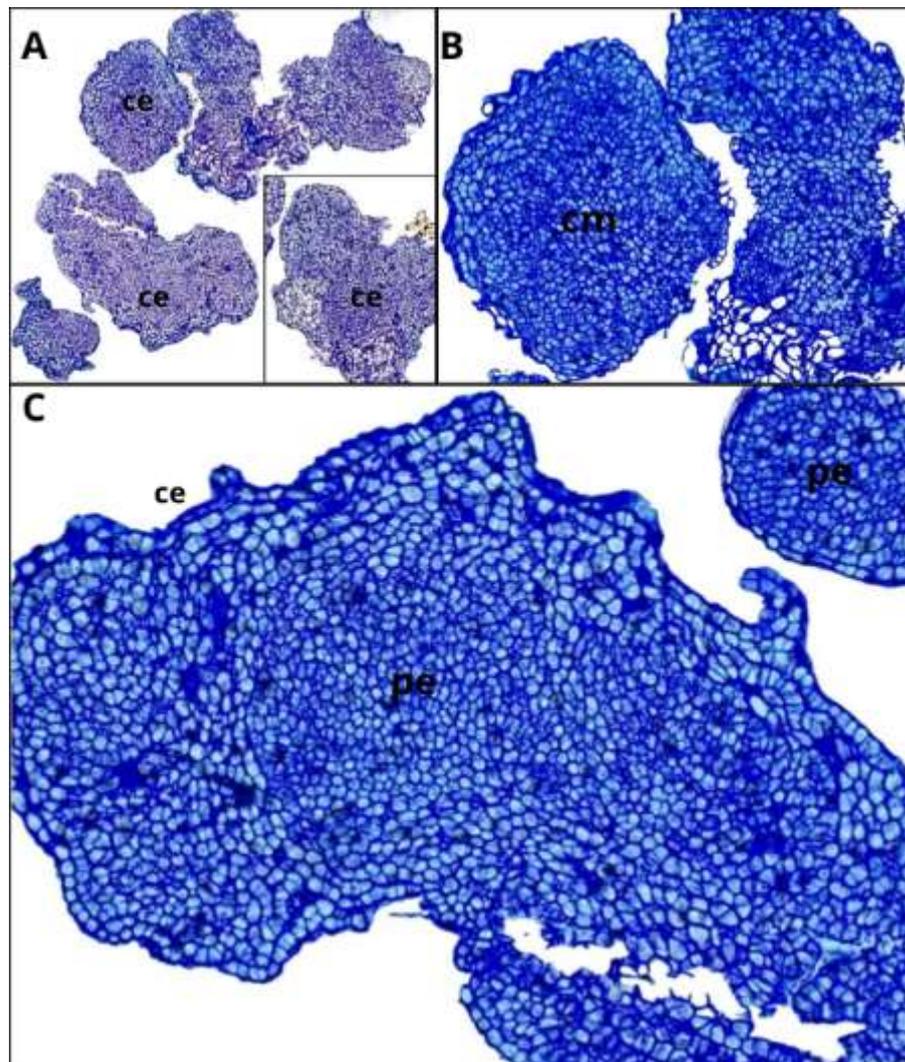


Figura 10. Seções anatômicas de agregados celulares oriundas da linhagem LT1 de folhas imaturas de *Euterpe precatoria* Mart. (açai-solteiro) após 100 dias de cultivo em meio líquido

suplementado com 5 μ M de 2,4-D (M4). A: Secção anatômica do calo embriogênico B. Detalhe do calo embriogênico da letra A com células meristemáticas. D. Detalhe da letra A com proembriões. Abreviações: ce, calo embriogênico; células meristemáticas. Configurações das imagens A = 4x. B = 10x. C = 20x.

Foi observada a presença de proembriões e embriões somáticos globulares (onde foi observada? Chamar as figuras). O corte anatômico mostrado na Figura 10 não só revela áreas meristemáticas/embriogênicas, mas também indica a presença de uma protoderme incipiente que envolve a massa calogênica globular (Fig. 10B). Isso sugere que as condições testadas no meio contendo 2,4-D favorecem a manutenção do potencial embriogênico dos calos e pode favorecer a formação de embriões somáticos no estágio globular. Essas características confirmam que os calos mantiveram potencial embriogênico quando cultivados em meio líquido.

O meio M5 proporcionou calos com zonas compostas por células meristemáticas, extensas e embriogênicas. Algumas zonas de rupturas de tecidos podem ser verificadas devido ao desprendimento de materiais na multiplicação (Figura 11 A-B).

Ainda na Figura 11, verifica-se nas letras C e E, a formação de embriões somáticos. Na letra “C”, os embriões somáticos possuem forma irregular, mas com protoderme evidente (seta). Nessa seção, também se verifica a presença de proembriões. Na letra “E”, o embrião do tipo torpedo pode ser facilmente verificado, com células alongadas do procâmbio evidente.

De maneira geral, as análises anatômicas revelaram a presença de proembriões e embriões somáticos do tipo torpedo e globular. Esses embriões apresentavam características anatômicas como protoderme, procâmbio e meristema fundamental. O procâmbio era composto por células alongadas. As análises anatômicas demonstram o potencial embriogênico nas linhagens de *E. precatória* cultivadas em meio líquido, sobretudo quando há 2,4-D presente no meio de cultivo. Adicionalmente, verificou-se a formação de embriões de embriões somáticos no estágio globular e similar ao torpedo.

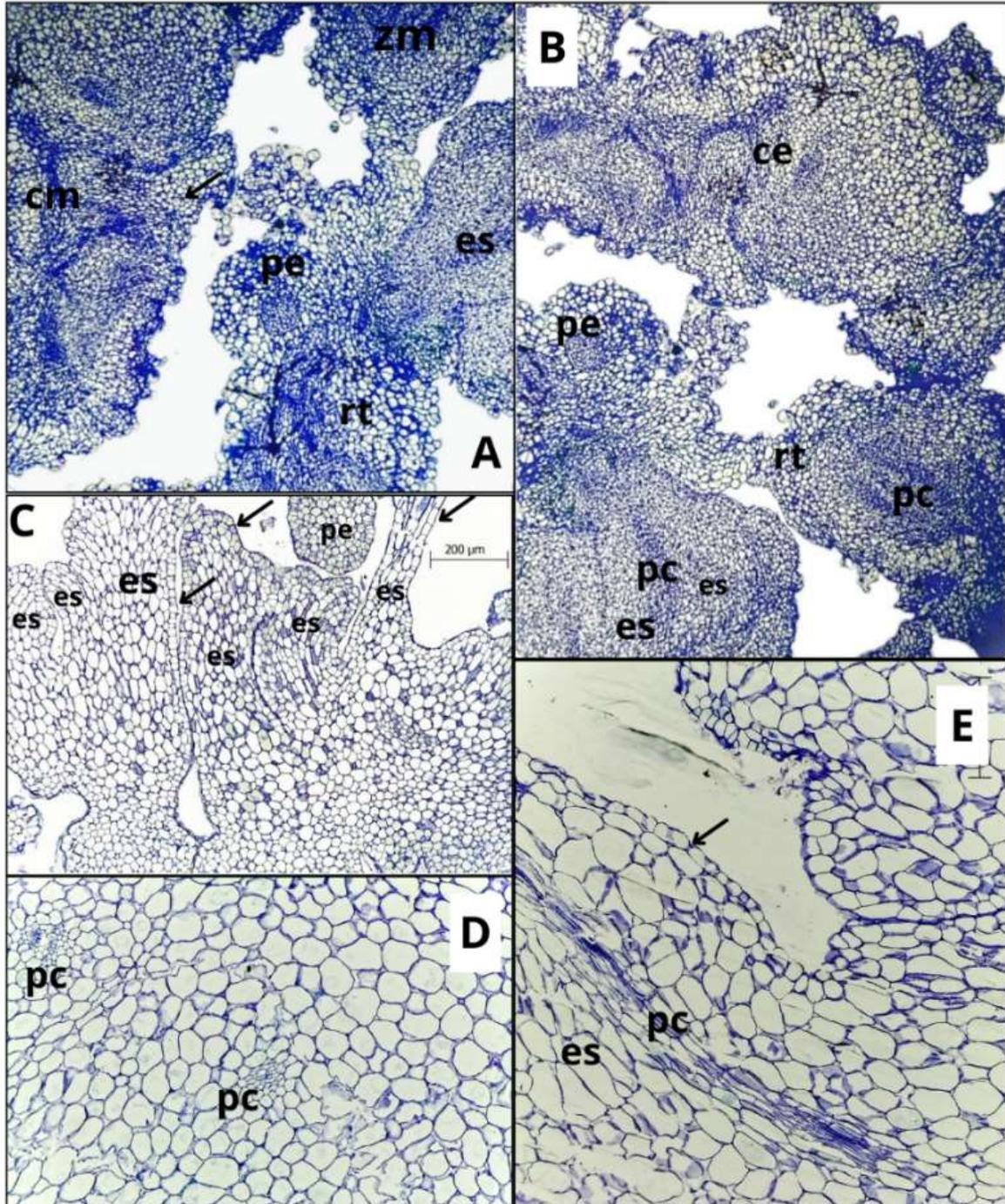


Figura 11. Secções anatômicas de agregados celulares oriundas de folhas imaturas de *Euterpe precatoria* Mart. (açai-solteiro) após 100 dias de cultivo em meio líquido 2,4-D+AIB (M2). A-B e CDE=2,4-D+ANA (M3). Secção com proliferação celular e novas formações globulares (seta). Procâmbio evidenciado e zona meristemática/embriogênicas evidentes. Indício de rompimento de tecidos para crescimento de calo. Abreviações: (pe) proembrião; calo embriogênico (ce); procâmbio (pc); (zm) zona meristemática e (rt) ruptura de tecidos. Configurações das imagens A-B = 4x. C=200µm. D-E: =500µm.

Características do crescimento e morfologia dos calos e agregados celulares oriundos de folhas imaturas de *Euterpe precatória*

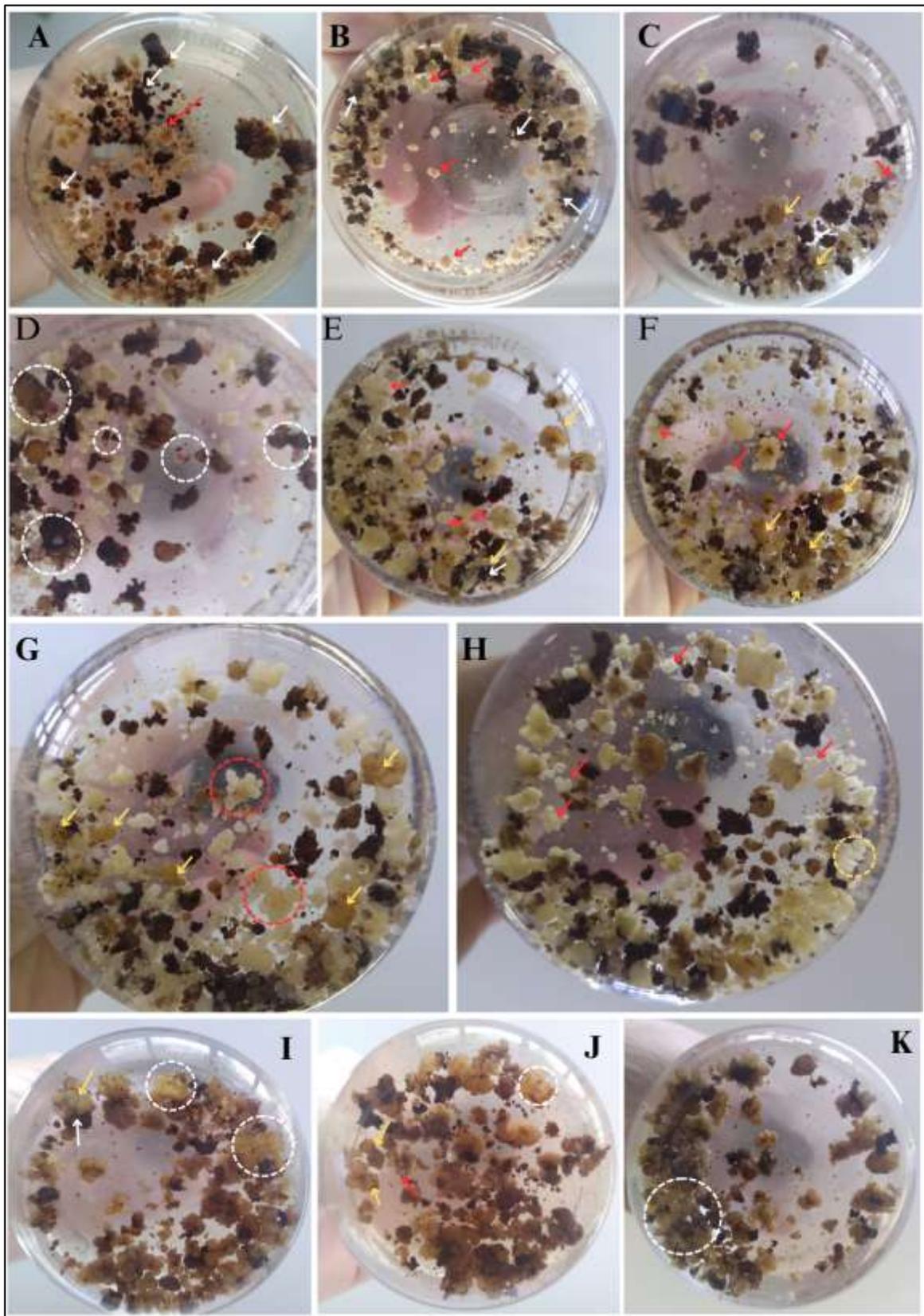


Figura 12. Aspectos morfológicos do crescimento em suspensão de calos e agregados celulares de linhagens de folhas imaturas de *Euterpe precatória* em diferentes meios de cultivo

(A-H linhagem LT2*M6 = Picloram+AIB; I-K = linhagem LT4*M1 = Picloram). A - Calos surgindo de outro calo oxidado (seta branca). Seta vermelha: calos embriogênicos de consistência friável de coloração amarela clara, com indício de surgimento de antocianinas. B - Parcela com calos branquinhos, com os mesmos aspectos de multiplicação descritos no item A. C - Multiplicação evidente em calos de natureza dura (seta amarela), e presença de antocianinas (seta vermelha). D - Calos com presença de antocianinas saindo de outros calos (círculo tracejado branco). E - F Multiplicação evidente em calos de natureza dura (seta amarela). Calos branquinhos de aspectos friáveis (seta vermelha). Calos surgindo de outro calo oxidado (seta branca). F- G Multiplicação evidente em calos de natureza dura (seta amarela). Calos branquinhos de aspectos friáveis (seta e círculo vermelho). H- Calos branquinhos de aspectos friáveis (seta e círculo vermelho) e possível formação e embriões somáticos em meio líquido (círculo amarelo). I - K Multiplicação evidente em calos de natureza dura (seta amarela); Calos surgindo de outro calo oxidado (seta branca); Calos em tons de verde (círculo branco).

Conforme as imagens acima (Figura 12), pode-se observar a presença de calos friáveis com coloração variando entre amarela (Fig. 12-A, I, J e K) branca (Fig. 12 B-F). Calos brancos do tipo friável foram constatados com predominância no meio com combinação das auxinas Picloram e AIB.

Tanto os calos presentes na Figura 12A (friáveis amarelos) quanto calos da Figura 12E (friáveis brancos) são desejáveis em sistema líquido de cultivo. Os calos friáveis amarelos são muito parecidos com os calos multiplicados em meio líquido da palmeira *Elaeis guineensis* em estudos desenvolvidos por Monteiro et al., (2018).

Verifica-se também a presença de calos de natureza dura (compacta)A presença de calos com aumento de massa e tons levemente esverdeados é verificada em meios com Picloram (Figura 12-I-K). Embora não friáveis, verificou-se a multiplicação em meio líquido. Tais calos apresentaram alta taxa de oxidação, além de pigmentação arroxeada, provavelmente, antocianina.

Calos de natureza duratambém foram vistos principalmente nos meios contendo auxinas combinadas (PIC+AIB) (Fig. 12 A-H). Nos meios que as auxinas não foram combinadas, as novas estruturas eram menos soltas, maiores e aderentes ao explante principal (Figura 12 I-K).

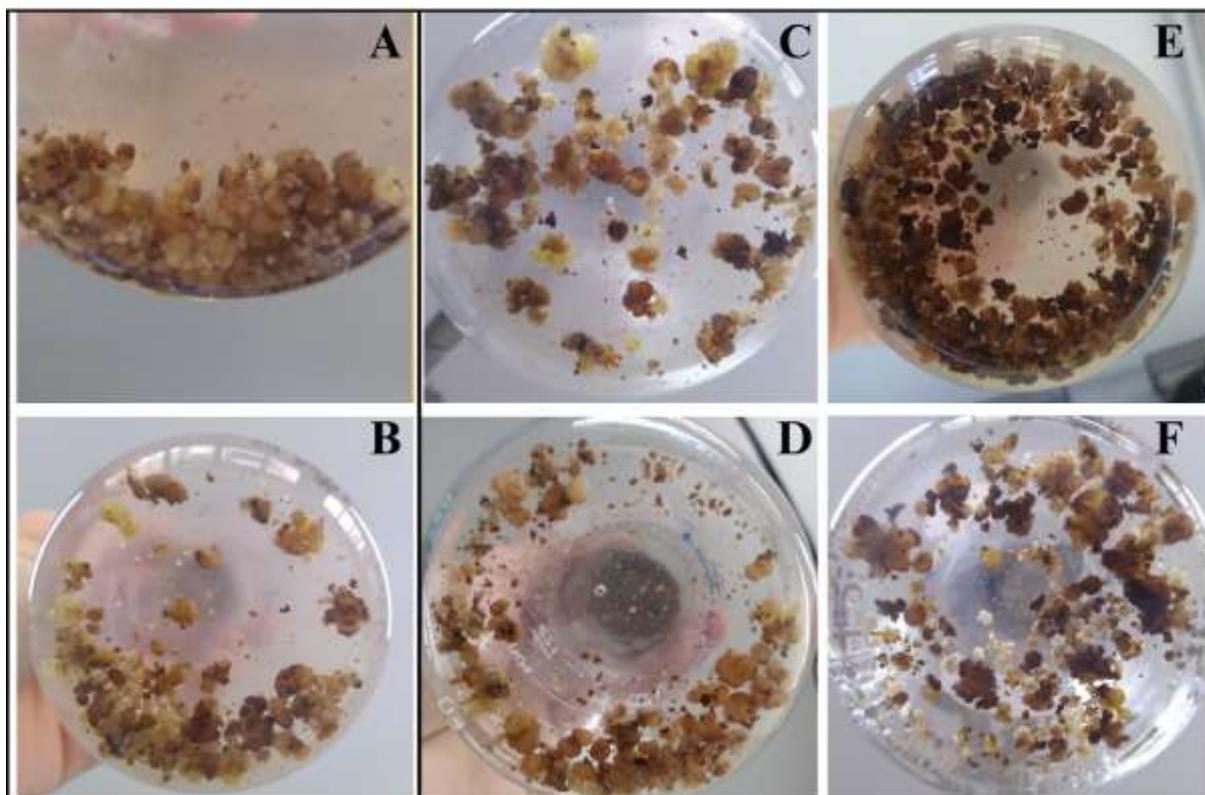


Figura 13. Aspectos morfológicos do crescimento em suspensão de calos e agregados celulares das linhagens de inflorescências imaturas de *Euterpe precatoria* em diferentes meios de cultivo.

A-B = Linhagens no meio Picloram+AIB (LT5*M3): Calos friáveis de tamanhos menores e possivelmente isodiamétricos. C-E = Linhagens no meio Picloram+ANA (LT6*M2): C-E Calos em tons de verde, com poucos setores dispersos no meio, com coloração variando entre branco e bege. D- Calos com poucos setores dispersos no meio, com coloração variando entre branco e bege. E- Presença de calos com tons esverdeados, variando entre tamanho e consistência. Presença de novos setores embriogênicos de natureza friável de cor branca.

Esses resultados evidenciados na Figura 13 A, B indicam que a proliferação dos materiais pode estar ligada ao tipo de nutrição fornecida, como é o caso da similaridade dos materiais cultivados com AIB, onde nota-se uma semelhança com os setores verificados na linhagem cultivada com 2,4-D+AIB.

Uma outra hipótese levantada, consiste em que embora a natureza dura seja verificada, estas possivelmente podem contribuir para multiplicação de setores mais soltos, isolados. Vale ressaltar, que os calos de natureza dura aqui verificados, geralmente formam massas mais expressivas, com estruturas que ficam aderidas ao calo originário/principal.

Portanto, a partir de tais resultados pode-se inferir que o meio de cultivo pode influenciar diretamente nessas características tanto quanto as variações epigenéticas singular do(a) calo/linhagem podem inferir na resposta deste quando inoculado em suspensão.

As diferentes formas de multiplicação dos calos de folhas imaturas podem ser vistas na figura 14.

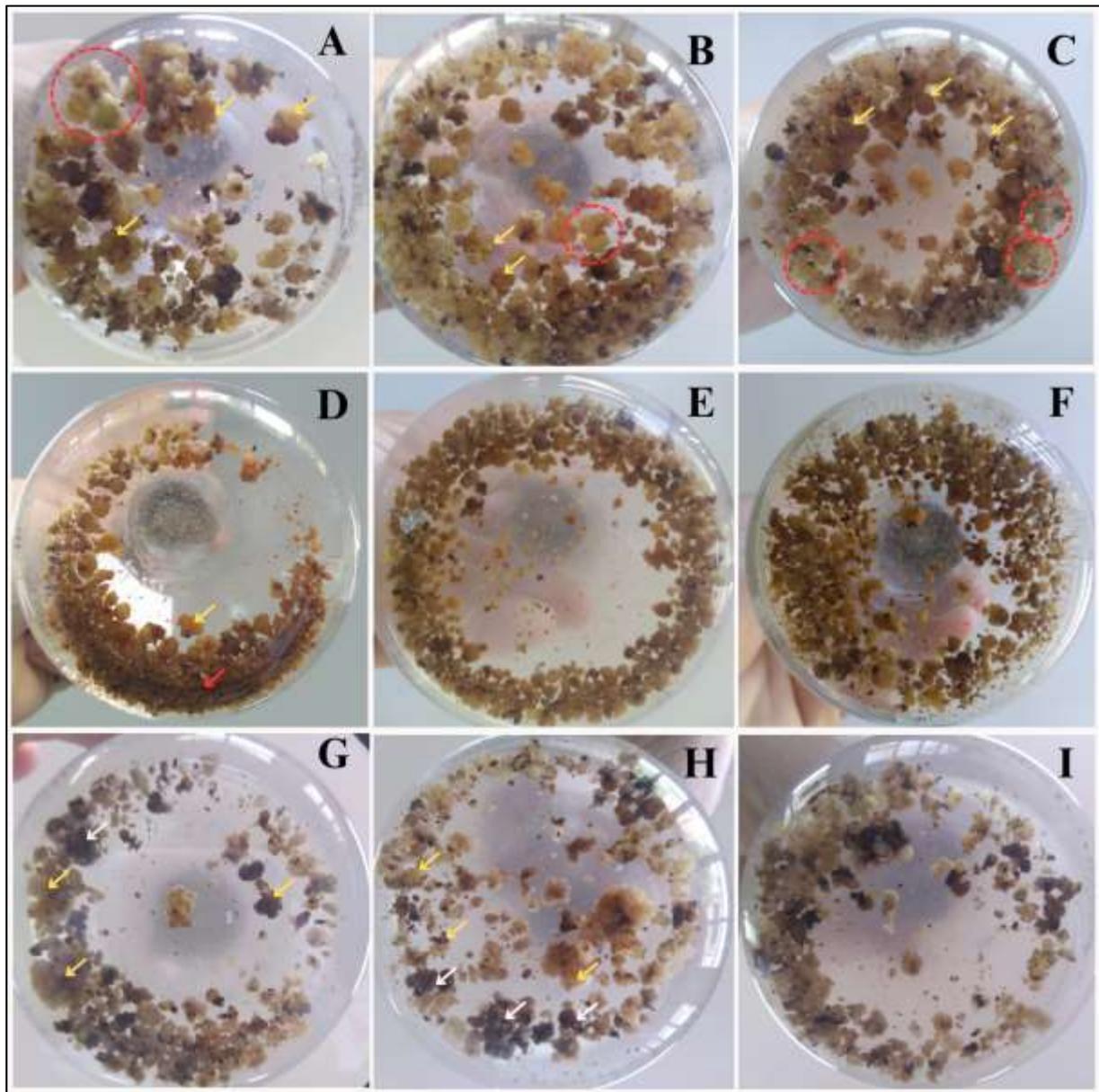


Figura 14. Aspectos morfológicos do crescimento em suspensão de calos e agregados celulares das linhagens de folhas imaturas de *Euterpe precatoria* em diferentes meios de cultivo.

A-C = Linhagens no meio 2,4-D (M4): Multiplicação em calos de natureza dura (seta amarela). Calos em tons de verde (círculo vermelho). D-F = Linhagens no meio 2,4-D+AIB (M6): Calos friáveis de tamanhos maiores e irregulares (seta amarela). Calos friáveis de tamanhos menores e possivelmente isodiamétricos (seta vermelha). E-G = Linhagens no meio 2,4-D+ANA (M5): Multiplicação em calos de natureza dura (seta amarela). Calos surgindo de outro calo oxidado (seta branca).

As linhagens cultivadas com tratamentos contendo 2,4-D somente apresentaram coloração variando entre branca, tons de bege e marrom (Figura 14 A-C). Linhagens cultivadas com meio 2,4-D com AIB apresentaram coloração específica variando de tons amarelos a marrons (Fig. D-F). Linhagens cultivadas com tratamentos contendo 2,4-D combinada com

ANA apresentaram coloração entre branca e levemente amarelo. Em todos os frascos com esse tratamento foi verificada a presença de antocianinas.

Comparando os aspectos morfológicos das linhagens cultivadas em meio líquido contendo 2,4-D com as linhagens cultivadas em Picloram, verifica-se maior capacidade de desprendimento dos setores, ou seja, materiais cultivados em 2,4-D apresentaram maior friabilidade que os cultivados com Picloram. Contudo, também é possível verificar a presença de calos com consistência dura, formando massas com tamanhos maiores que os demais e colocação levemente esverdeada (Fig. 14 A-C).

Calos cultivados com 2,4-D tiveram menor incidência (porcentagem) de oxidação que os calos cultivados com Picloram. A homogeneidade entre as linhagens cultivadas em meio com 2,4-D foi mais evidente que para aquelas linhagens cultivadas com Picloram. Calos de natureza compacta e com potencial de multiplicação também foram visualizados em meios suplementados com 2,4-D.

Especificamente na linhagem LT2*M6, cultivada com 2,4-D+AIB, embriões somáticos em estados diferenciados podem ser observados em tons esverdeados aos 90 dias de cultivo (Figura 15).

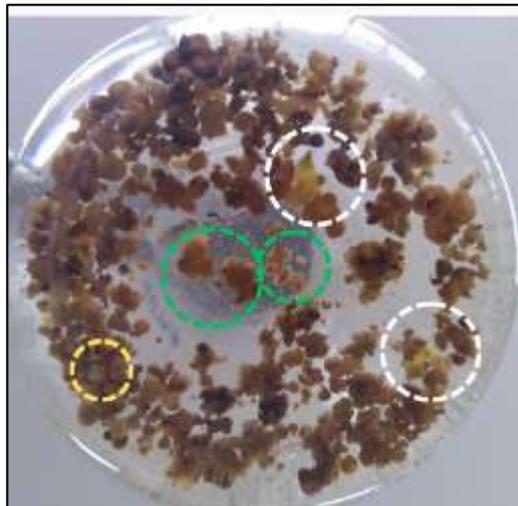


Figura 15. Aspectos morfológicos do crescimento em suspensão de calos e agregados celulares da linhagem LT2 no meio 2,4-D+AIB (M6) de folhas imaturas de *Euterpe precatoria* aos 90 dias de cultivo. Setas brancas: embrião somático diferenciado em tons de verde. Seta amarela: embrião somático diferenciado de coloração com ausência de clorofila. Seta verde: calos friáveis.

Experimento 2: Efeito do meio de cultura e da combinação de diferentes auxinas na multiplicação de agregados celulares e células em suspensão de linhagens oriundas de material somático de inflorescências imaturas *Euterpe precatoria* Mart.

Estabelecimento e multiplicação de agregados celulares e células em suspensão de tecidos somáticos de inflorescência imaturas de *E. precatoria* Mart.

As linhagens de inflorescências imaturas também passaram por repouso, e conforme os resultados apresentados por folha, igualmente permaneceram estáveis, inclusive sob agitação. Aos trinta dias de cultivo, os materiais se mantiveram em estabilidade, sem contaminação e sem oxidação. Em termos morfológicos, as mudanças da proliferação eram superficiais, com poucos frascos apresentando novas estruturas presentes no meio.

Verificou-se que as linhagens cultivadas em novos meios de suspensão foram bem-sucedidas o estabelecimento foi alcançado. Aos 45 dias, as linhagens demonstravam algumas mudanças morfológicas. Assim como em folhas, aquelas estruturas que exibiam calos intumescidos, indicando um aumento no volume do calo, ou frascos com um aumento na densidade dos propágulos que não foram afetados pela oxidação a ponto de prejudicar seu crescimento em suspensão, foram definidos como linhagens estabelecidas.

Embora os novos métodos empregados neste estudo garantiram a sobrevivência de todas as linhagens, a otimização não foi alcançada em todas elas. As linhagens bem-sucedidas nos novos meios de multiplicação em suspensão foram LT7 (cultivada no meio M4), LT2 (cultivada no meio M3) e LT9 (cultivada no meio M5) (Tabela 8). Diferenças significativas foram observadas nos resultados, tanto em relação ao tipo do meio de cultivo, quanto em relação ao tempo de cultivo, conforme demonstrado pelo teste Scott-Knott ao nível de significância de 5% (Tabela 4).

Tabela 8. Desdobramento das médias de incremento de volume (mL) de agregados celulares material somático oriundos de inflorescências imaturas de *E. precatoria* Mart. cultivadas em diferentes meios de suspensão celular sob agitador industrial a 100 rpm, em função da linhagem celular em cada tempo de cultivo, pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. LG = Linhagem genética; MC = meio de cultivo.

LG*MC	Período				Equação da regressão	R ²
	45	90	135	180		
LT7 * M4	2,0 aB	5,14 aA	4,06 aA	3,87 aA	$y = -0,0003x^2 + 0,066x + 0,2804$	0,88
LT8 * M6	1,15 aA	1,72 bA	0,86 bA	1,12 bA	$y = -5E-05x^2 + 0,0127x + 0,5089$	0,78
LT9 * M5	0,92 aA	1,41 bA	1,07 bA	1,25 bA	$y = -8E-05x^2 + 0,0162x + 0,5639$	0,54
LT10 * M1	1,75 aB	2,25 bB	3,43 aA	4,75 aA	$y = 3E-05x^2 + 0,0175x + 0,6161$	0,98
LT11 * M2	1,56 aA	2,43 bA	2,12 bA	1,25 bA	$y = -0,0002x^2 + 0,0367x + 0,4393$	0,97
LT12 * M3	2,68 aA	4,50 aA	3,93 aA	3,17 aA	$y = -0,0003x^2 + 0,0672x + 0,4579$	0,97

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância.

Nota: M1 =PIC; M2 = PIC+AIB; M3 = PIC+ANA; M4=2,4-D; M5=,4-D+AIB; e M6=2,4-D+ANA.

A tabela evidencia diferenças significativas somente a partir dos 90 dias cultivo entre as linhagens. Nesse período as linhagens com volume significativamente superior foram LT7 cultivada no meio M4, com 5,14 mL de volume mensurado (maior média de volume observado), e a linhagem LT12 cultivada no meio M3, com 4,50 mL de volume observado.

Ao s 135 dias de cultivo, a linhagem LT7 continuo com a maior média de volume mensurado, seguidamente das linhagens LT12 (3,93 mL de volume) e da linhagem LT10 (3,43 mL de volume). Essas linhagens foram significativamente superiores às demais linhagens pelo teste Scott-Knott a 5% de significância.

Aos 180 dias, as linhagens acima mencionadas continuavam com superioridade significativa com relação as demais linhagens. Para tanto, nesse período a linhagem LT10 manteve-se em vantagem significativa com relação as linhagens LT7 e LT12. Os resultados evidenciaram que os meios de cultivos favoreceram o crescimento das linhagens de inflorescências imaturas em suspensão, sendo superior no meio contendo auxina 2,4-D M4.

A auxina Picloram (M1) também evidenciou resultados positivos, sobretudo quando combinada a auxina ANA (M3). Tais aspectos revelam que é possível contemplar a etapa de suspensão em protocolos de ES usando materiais genéticos oriundos de inflorescências.

No que se refere ao material genético (linhagens) dentro de cada meio de cultivo, percebe-se que tanto para a linhagem LT7, quanto para a LT12 o desenvolvimento é significativamente maior a partir dos 90 dias de cultivo. Já para a linhagem LT10, essa diferença ocorre somente a partir dos 135 dias de cultivo.

Quando comparamos o efeito do meio de cultivo em cada tempo nas diferentes linhagens, e o efeito do meio de cultivo de cada linhagem isoladamente dentro de cada tempo, pode-se verificar que as linhagens com os menores níveis de volumes mensurados LT8, LT9 e LT11 foram semelhantes entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de significância em cada interação acima mencionada. Essas linhagens apresentaram um comportamento similar ao longo do experimento.

Para os componentes da regressão, verifica-se baixo ajustamento da linhagem LT9. Para tanto, deve-se manter em consideração as diferenças significativas da regressão entre as linhagens, no que se refere ao crescimento celular em volume ao longo do tempo. No entanto, para entender melhor o comportamento distinto dos resultados verificados, aplicou-se a fórmula de Sturges (1926) para uma melhor compreensão das estimativas (Fig.15).

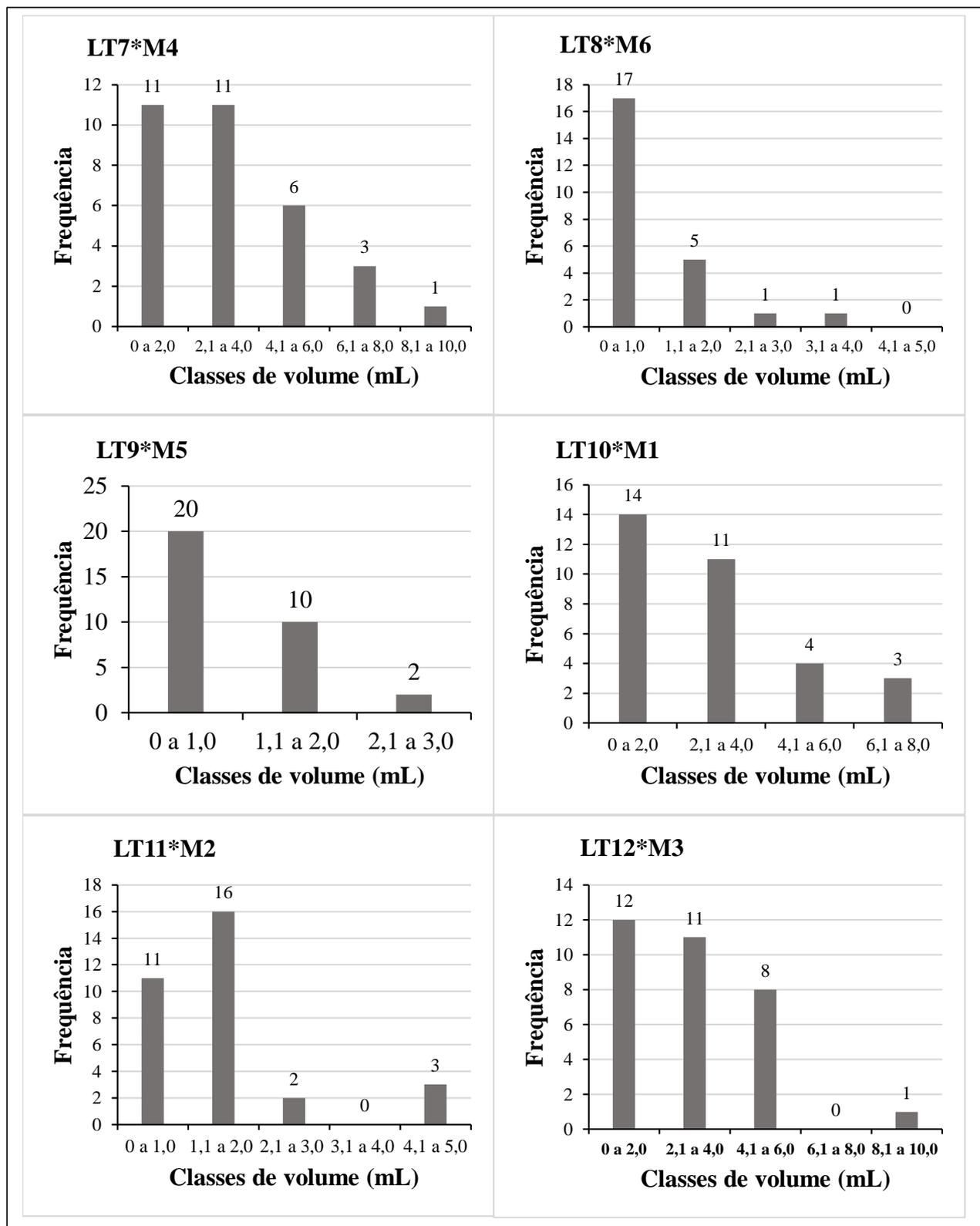


Figura 15. Distribuição por classe de volume de agregados e células em suspensão oriundas de linhagens de inflorescências imaturas de *Euterpe precatoria* Mart. (Método estatístico de Sturges).

Nota: M1 =PIC; M2 = PIC+AIB; M3 = PIC+ANA; M4=2,4-D; M5=,4-D+AIB; e M6=2,4-D+ANA.

Assim como no experimento anterior, o número de frascos permitiu a estimativa das classes de volumes em histogramas pelo método de Sturges (1926). Os resultados apontam desde classes amplas, regulares à classes vazias. Esses resultados complementam e esclarecem a comparação dos resultados evidenciados na tabela 8.

Apenas a linhagem LT7 apresentou cinco classes com frequência de observações em todas elas. Embora muitas observações (11) tenham sido frequentes na primeira classe (0 a 2,0 mL de volume) para essa linhagem, o número de observações entre 2,1 a 8,0 mL de volume celular sedimento foi de 20. A única linhagem com comportamento similar a esta é a LT10. Uma única observação acima de 8,1 mL de volume sedimentar foi verificado para linhagem LT7, essa observação pode ter influência direta nos resultados da ANOVA para o período em que foi mensurado.

A linhagem LT10 apresentou 18 observações entre 2,1 a 8,0 mL de volume sedimentar mensurado, sendo onze observações entre 2,1 e 4,0, quatro observações entre 4,1 e 6,0 e três observações entre 6,1 e 8,0. Esses dados embora pouco abaixo da linhagem LT7, são muito próximos. Tais aspectos podem indicar uma correlação positiva existente entre as mesmas. Para tanto, quase 50% de todas as observações realizadas nessa linhagem ficaram na primeira classe de volume, entre 0 e 2,0mL.

A linhagem LT12, apresentou 18 observações entre a segunda e a terceira classe (2,1 a 4,0 e 4,1 a 6,0 mL). Esse número é igual/próximo aos verificados pelas linhagens L10 e LT7, respectivamente. Assim, como na linhagem LT7, uma única observação foi verificada entre 8,1 a 10 mL de volume.

É possível verificar que as linhagens LT8, LT9 e LT11 apresentaram muitas observações nas classes mais baixas de volume. Esses resultados mostram um crescimento inferior aos demais tratamentos, não sendo indicados para cultivo em suspensão.

Tais aspectos implicaram diretamente na taxa média de crescimento (TCM%), onde as linhagens LT8, LT9 e LT11 apresentaram as menores TCM (Fig. 16). De maneira geral, as linhagem LT8, LT9 apresentaram menores taxas de crescimento ao longo do cultivo. Com crescimento pouco expressivo, essas linhagens alcançaram níveis em torno de 2000% de TCM aos 90 dias de cultivo (Figura 16).

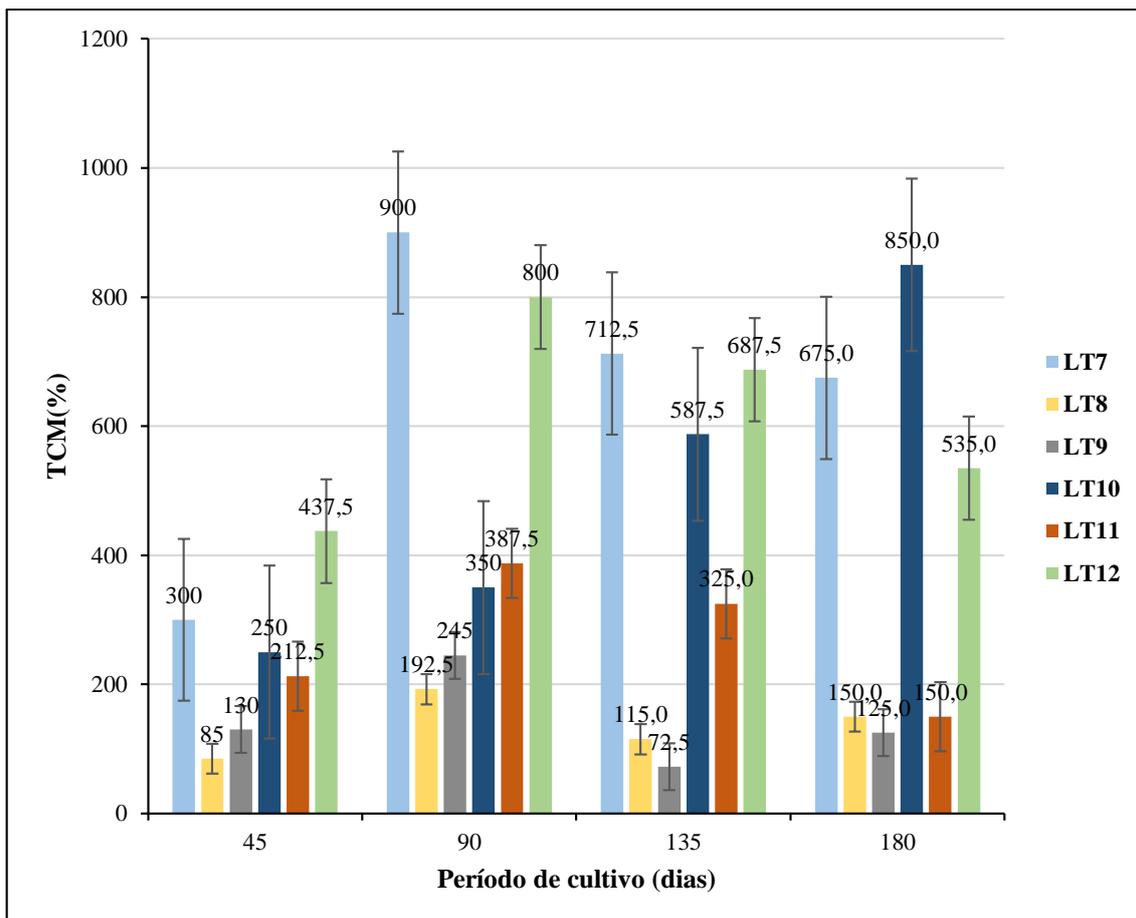


Figura 16. Taxa média de crescimento (% TCM) de calos e agregados celulares em suspensão de materiais somáticos de inflorescências imaturas de *Euterpe precatoria* Mart. ao longo dos 180 dias de inoculação. Barras representam o erro padrão médio.

Nota: M1 =PIC; M2 = PIC+AIB; M3 = PIC+ANA; M4=2,4-D; M5=,4-D+AIB; e M6=2,4-D+ANA.

Os melhores resultados para TCM foram observados na linhagem LT7 aos 90 dias de cultivo, alcançando em média 900% de crescimento. Aos 135 dias, essa linhagem alcançou uma TCM média de 700%, com níveis próximos a este aos 180 dias no meio de suspensão.

A linhagem LT12 constitui a segunda linhagem com maior TCM ao longo dos períodos de cultivos, com pico de crescimento aos 90 dias atingindo uma TCM média de 800% em volume celular sedimentado. Aos 45 dias, essa linhagem obteve uma maior TCM entre todas. Aos 135 dias, verifica-se uma taxa média de crescimento equivalente a mais de 600%, sendo a segunda maior verificada nesse período, e níveis próximos a 600% aos 180 dias.

A linhagem LT10 apresentou uma TCM média crescente, desde os 45 dias até a última mensuração aos 180 dias. Aos 45 a TCM correspondia a 250%, 350% aos 90 dias. Aos 135 DIAS, a TCM chegou próximo de 600%, atingindo pico aos 180 dias com mais de 800% de crescimento em volume em relação ao período inicial.

Cinética de crescimento e aplicação de modelo matemático de Gompertz de agregados celulares e células em suspensão de tecidos somáticos de inflorescência imaturas de *E. precatoria* Mart

O modelo de Gompertz mostrou padrões ajustam (LT7, LT8, LT10 e LT12) e padrões que não foram ajustados ao modelo em relação à cinética do crescimento, como foi o caso da linhagem LT9 apresentado baixo percentual de coeficiente de correlação (53%) Tabela z.

As linhagens de inflorescências imaturas com os melhores desempenhos em incremento de volume, apresentaram coeficiente de correlação satisfatórios (78% para linhagem LT7, 93% para linhagem LT10 e 76% para linhagem LT12), considerando assim que o modelo foi adequado para descrever a cinética de crescimento dos calos e agregados celulares em suspensão (Tabela 9).

Tabela 9. Constantes do modelo de Gompertz ($Y = a * e^{(-be^{-c*t})}$) das suspensões de linhagens oriundas de tecidos somáticos de inflorescências imaturas de *Euterpe precatoria* Mart. cultivadas em diferentes meios de cultivo, sob agitador industrial a 100 rpm durante 180 dias de cultivo.

Parâmetros	Linhagens genéticas					
	LT7 (2,4-D)	LT8 (2,4-D+ANA)	LT9 (2,4-D+AIB)	LT10 (PIC)	LT11 (PIC+AIB)	LT612 (PIC+ANA)
a	1,60797325	0,76924258	0,7723755	1,813400	1,0067039	1,4962432
b	1,458741	0,636892	0,645615	1,371230	0,914865	1,320634
c	0,03544897	0,02791698	0,0736083	0,013654	0,0566595	0,0522984
R ² (%)	78	79	53	93	69	76

Nota: M1 =PIC; M2 = PIC+AIB; M3 = PIC+ANA; M4=2,4-D; M5=2,4-D+AIB; e M6=2,4-D+ANA.

Assim, a dinâmica de crescimento das linhagens foi verificada pelo modelo de Gompertz, que permitiu diferentes respostas quando se observa as curvas de crescimento (Figura 17).

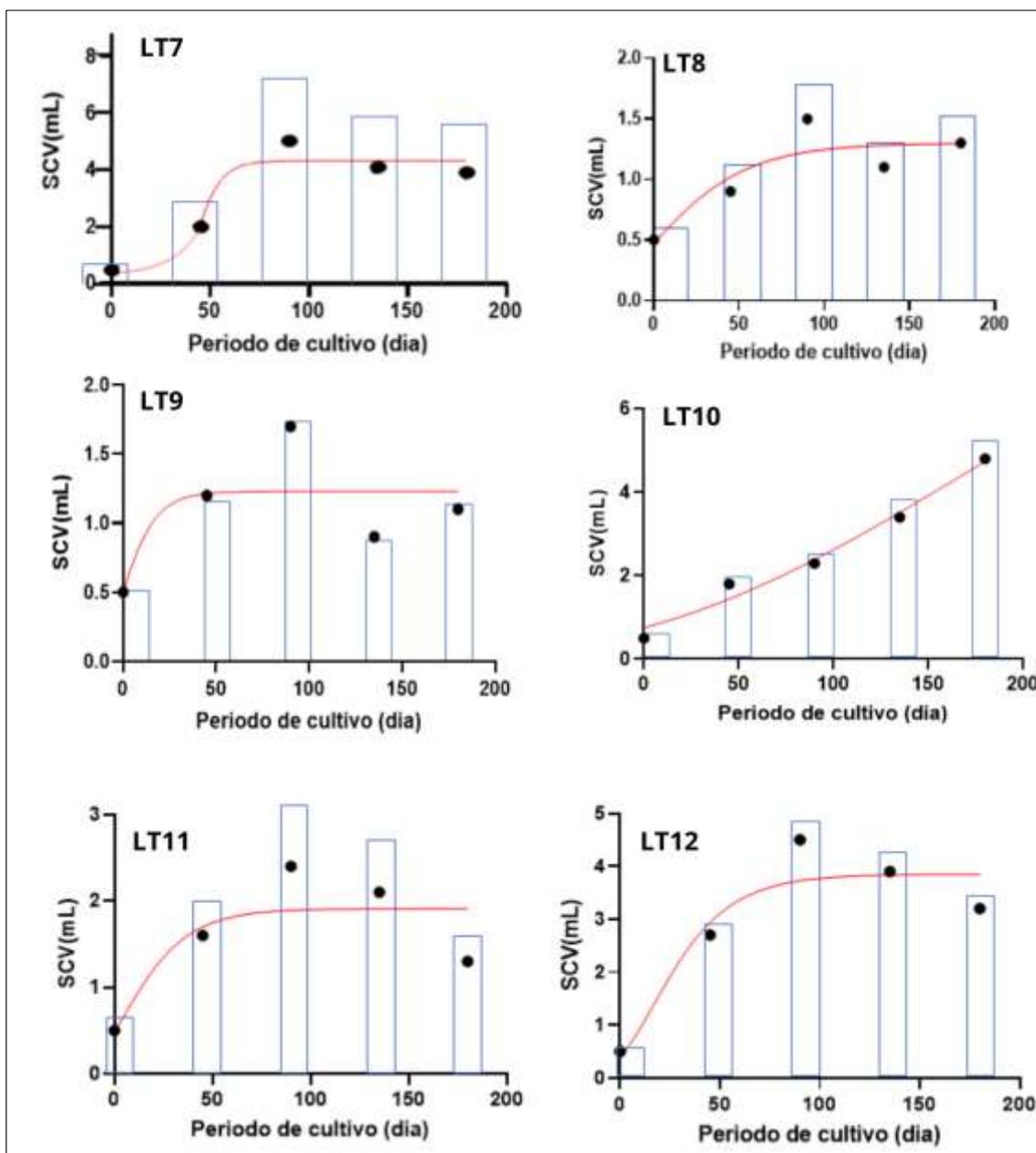


Figura 17. Curvas de crescimento dos calos e agregados celulares de inflorescências imaturas de *Euterpe precatoria* em suspensão, ajustadas ao modelo de Gompertz ($Y = a * e^{(-be^{-c*t})}$) em função do cultivo de diferentes linhagens em diferentes meios ao longo de 180 dias de incubação.

Os gráficos evidenciam a dinâmica diversificada das linhagens. A linhagem LT7 apresenta as maiores médias, para descrição da cinética. Observa-se a forma sigmoide apresentada pela curva de crescimento da linhagem, permanecendo em média por 12,9 dias na fase lag, seguida da fase exponencial até os 45 dias.

Após esse período, a fase linear foi verificada até aproximadamente os 60 dias de cultivo, atingindo a estabilidade a partir dos 75 dias. Dessa forma, entende-se que o pico de crescimento em volume foi atingido aos 90 dias de cultivo. Assim sendo, recomenda-se que entre os 75 e os

90 dias de cultivo, seja feito o plaqueamento para prosseguimento das etapas seguintes da ES. A taxa de crescimento máximo específico (μ_{max}) foi de $0,06d^{-1}$ com um tempo de duplicação (G) de 12,16 dias até que as culturas atingissem a fase estacionária (Tabela B).

Para linhagem LT10, o crescimento não foi característico de uma curva sigmoide, havendo um padrão linear. Essa dinâmica implicou também numa longa fase lag de 27,19 dias com ausência da fase de estabilidade, havendo o crescimento contínuo ao longo do tempo.

A taxa de crescimento máximo específico (μ_{max}) foi de $0,02d^{-1}$ com um tempo de duplicação (G) de 27,99 dias (Tabela 10). Como o crescimento foi contínuo, pode-se transferir tanto aos 90 quanto aos 135 dias os calos para plaqueamento, observando a transferência antes da troca de meio.

Já a linhagem LT12 apresentou uma fase lag de 6,13 dias, estabilizando por volta dos 90 dias, sendo indicado esse período para plaqueamento. A taxa de crescimento específico máximo (μ_{max}) foi de $0,08d^{-1}$ com um tempo de duplicação (G) foi de 0,46 dias (Tabela 10). A curva teve forte tendência de padrão sigmoide.

As linhagens LT8, LT9 e LT11 apresentaram as menores incremento em volume. Conforme os gráficos da figura 17, a linhagem LT8 entrou em estabilidade aproximadamente logo após o centésimo dia com baixos níveis de volume. A linhagem LT9 entrou em estabilidade logo aos exatos 45 dias, um período mais curto e também com baixos níveis. Já a linhagem LT11, adquiriu estabilidade por volta dos 75 dias de cultivo, com valores um pouco superior em relação aos observados pelas linhagens LT8 e LT9.

Essas linhagens, não apresentaram fase lag ($\lambda = -13,01, -4,81$ e $-1,5$, respectivamente) sendo diretamente adentradas na fase exponencial. O modelo foi bem ajustado, tendo em vista os valores dos coeficiente de correlação terem sido acima de 70% (Tabela 10).

Tabela 10. Parâmetros Cinéticos das suspensões de materiais somáticos de inflorescências imaturas de *E. precatória* Mart. cultivadas em meio de suspensão celular sob agitador industrial a 100 rpm em função da linhagem celular e do meio de cultivo ao longo de 180 dias.

Parâmetros	Cultivos em Suspensão de Folha					
	LT7 (2,4D)	LT8 (2,4D+ANA)	LT9 (2,4D+AIB)	LT10 (PIC)	LT11 (PIC+AIB)	LT12 (PIC+ANA)
μ_{max} (d^{-1})	0,06	0,02	0,06	0,02	0,06	0,08
λ (dia)	12,94	-13,01	-4,81	27,19	-1,5	6,13
G (dia)	12,16	0,90	0,54	27,99	12,15	0,46
R ² (%)	87	84	99	76	96	93

Legenda: μ_{max} = velocidade máxima específica de crescimento. λ = tempo de fase lag (d). G = tempo de regeneração das células. R² = coeficiente de correlação.

Nota: M1 =PIC; M2 = PIC+AIB; M3 = PIC+ANA; M4=2,4-D; M5=2,4-D+AIB; e M6=2,4-D+ANA.

Caracterização do tamanho dos calos e agregados celulares em suspensão

A verificação da presença de calos muito grandes pode subsidiar detalhes da suspensão que merecem mais atenção nos trabalhos futuros. Tais aspectos podem garantir uma melhor etapa de crescimento e um desenvolvimento mais homogêneo. Assim, com base na tabela 11, verificou-se a presença de calos grandes ao longo dos períodos de cultivo.

Tabela 11. Porcentagem de Formação de Calos Grandes das suspensões de materiais somáticos de inflorescências imaturas de *Euterpr precatória* Mart. cultivadas em meio de suspensão celular sob agitador industrial a 100 rpm em função da linhagem celular e do meio de cultivo ao longo de 180 dias.

Linhagens * Meio de cultivo	Período de Cultivo (dias) e ocorrência de calos grandes (%)			
	45	90	135	180
LT7 * M4	62,5	100	75	50
LT8 * M6	25	37,5	50	50
LT9 * M5	50	87,5	75	50
LT10 * M1	25	100	75	62,5
LT11 * M2	37,5	66,66	50	37,5
LT12 * M3	50	100	75	37,5

Nota: Nota: M1 =PIC; M2 = PIC+AIB; M3 = PIC+ANA; M4=2,4-D; M5=,4-D+AIB; e M6=2,4-D+ANA.

A linhagem LT7 apresentou a maior incidência de calos grandes logo aos 45 dias, com aproximadamente 62,5% das parcelas. Nas linhagens LT9 e LT12 50% das parcelas apresentaram ocorrência de calos grandes, sendo o segundo maior valor observado.

Aos 90 dias de cultivo, as linhagens LT7, LT10 e LT12 apresentaram 100% formação de calos grandes. Todas as parcelas dessas linhagens tiveram pelo menos a presença de um calo com tamanho desproporcional ao esperado. Conforme eram retirados, a porcentagem decrescia ao longo do tempo sob experimento. A linhagem LT9 apresentou equivalente 87,5% das parcelas contendo calos grandes.

Aos 135 dias de cultivo, 75% das parcelas apresentaram calos grandes nas linhagens LT7, LT9, LT10 e LT12, respectivamente. Aos 180 dias, a linhagem com maior percentual de ocorrência de calos grandes foi a LT10, seguida das linhagens LT7, LT8 e LT9 com ocorrência de calos grandes em 50% das parcelas. Nesse período, verifica-se que a linhagem LT12 conseguiu estabilizar com apenas 37,5% dos frascos apresentando calos desproporcionais em tamanho. Baixos percentuais de calos pequenos apresentam tendência de homogeneização.

Assim como no experimento de folhas imaturas, a oxidação também foi pertinente nas linhagens de inflorescências imaturas, sendo verificado o mesmo comportamento oxidativo nas linhagens aqui analisadas (tabela 12).

Tabela 12: Porcentagem e grau de oxidação de cultivos em suspensão de materiais somáticos de inflorescências imaturas de *E. precatória* Mart em meio líquido.

MG x MC	Porcentagem e Grau de oxidação por período de Cultivo (dias)								
	30	45	Grau	90	Grau	135	Grau	180	Grau
LT7*M4	0	25	+	83	++	85	+++	85	+++
LT8*M6	0	25	+	75	+++	75	+++	75	+++
LT9*M5	0	33	+	62,5	+++	62,5	+++	62,5	+++
LT10*M1	0	25	+	83	+++	85	+++	85	+++
LT11 M2	0	33	+	100	+++	100	+++	100	+++
LT12*M3	0	33	+	100	++	100	+++	100	+++

Nota: M1 =PIC; M2 = PIC+AIB; M3 = PIC+ANA; M4=2,4-D; M5=2,4-D+AIB; e M6=2,4-D+ANA.

Com 30 dias de cultivo, as linhagens não apresentaram oxidação. Aos 45 dias, todas as linhagens apresentaram baixo grau de oxidação. Aos 90, 135 e 180 dias, as linhagens LT11 e LT12 apresentaram 100 % de oxidação. Esse comportamento indica que a oxidação foi observada em todas as parcelas dessas linhagens, em que pelo menos metade ou mais calos foram constatados com forte oxidação nas parcelas.

Como o grau oxidativo nessas parcelas foi elevado, isso significa que o número de calos oxidados após a manutenção do meio de cultivo foi expressivo. Ainda nos 90 dias de cultivo, a incidência de oxidação em grau moderado foi observado somente nas linhagens LT7 e LT12. Em todas as outras linhagens inclusive nos demais períodos de cultivo, a ocorrência de oxidação foi um problema após a manutenção do meio de cultivo. Embora a incidência em porcentagem tenha ocorrido de maneira distinta entre as mesmas.

Os resultados apontam que embora a incidência e ocorrência em grau elevado da oxidação tenha ocorrido no cultivo das linhagens de inflorescências imaturas em meio líquido, esse problema pôde ser superado para as linhagens LT7, LT10 e LT12 e a multiplicação foi mantida.

Para as demais linhagens, esse fator pode ser sido a principal causa dos menores níveis de multiplicação verificados, embora isso varia de linhagem para linhagem. No que se refere à contaminação, somente as linhagens LT8, LT9 e LT12 apresentaram contaminações (25%, 37,5% e 12,5%, respectivamente). Para tanto assim como em folhas imaturas, esse fato ocorreu somente após a troca de meio no período de 180 dias de cultivo.

Características anatômicas dos calos em meio líquido

Na linhagem LT7, cultivada em meio contendo auxina 2,4-D (Fig. 18), nota-se um intenso processo de divisão celular, com aglomerados embriogênicos isolados (Fig. 18). Os proembriões observados assemelham-se àqueles reportados, também em *E. precatória*, por Ferreira et al. (2022b), típicos de calos friáveis.

Esses resultados indicam que a manutenção do estágio indiferenciado por um período maior, e, portanto, a LT7 em meio contendo 2,4-D pode ser mantida sob as condições testadas para fins de multiplicação por mais tempo. A natureza friável dos agregados dessa linhagem provavelmente está relacionada ao fácil desprendimento de proembriões, como visualizado na Fig. 18, itens A e B.

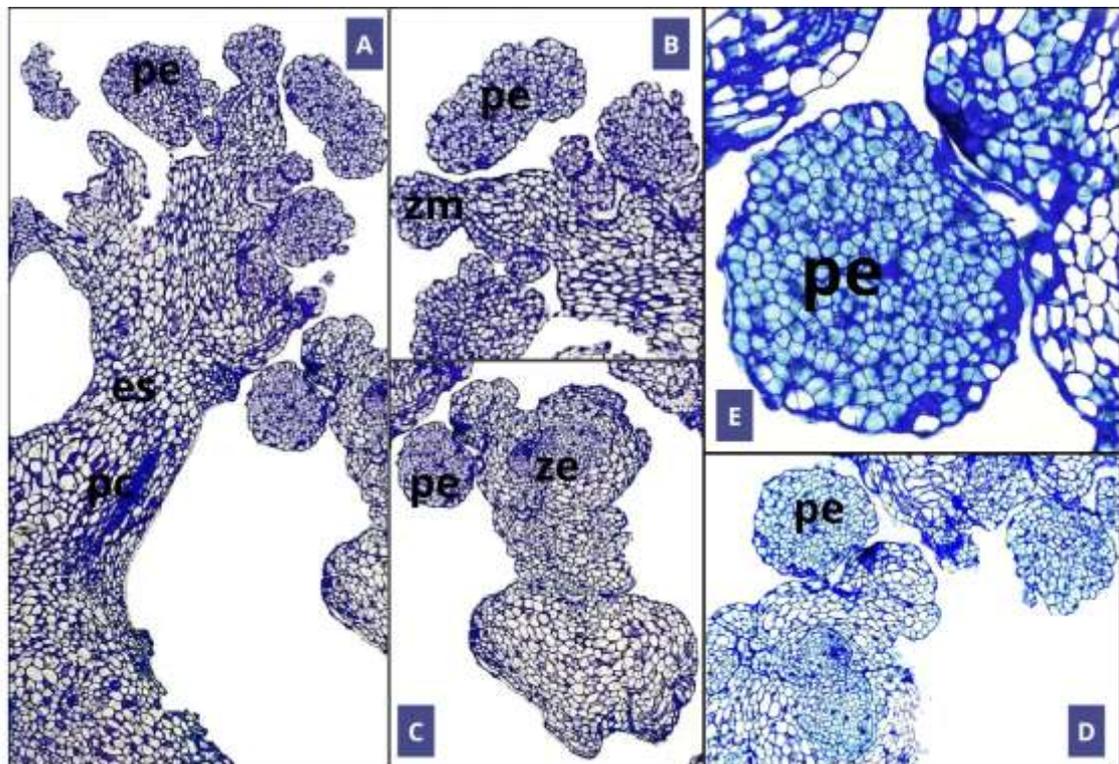


Figura 18. Secções anatômicas de agregados celulares oriundas de inflorescências imaturas de *Euterpe precatoria* Mart. (açai-solteiro) após 100 dias de cultivo em meio líquido 2,4-D (M4) para a linhagem LT7. A. Secção anatômica evidenciando embrião somático tipo torpedo e proembriões somáticos provenientes de células em proliferação na parte meristemática. B. Detalhe da zona meristemática do item A. C-D. Secção anatômica de calo formando estruturas embriogênicas globular e proembriões. D-E. proembriões somáticos e zona de células com divisão celular. Abreviações: (es) embrião somático; (pc) procâmbio; (zm) zona meristemática; (ze) zona embriogênica; (pe) proembriões somáticos. Configurações das imagens A = 4x; B-C-D=10x; E=20x.

As análises anatômicas mostram ainda o desenvolvimento de embriões somáticos, aos 100 dias de cultivo nas linhagens LT7 e LT10, cultivadas nos meios M4 (2,4-D) e M1(PIC) sendo possíveis de observação nas figuras 18-A e 18-B. Os resultados evidenciam que tanto auxina

2,4-D (Fig. 18-A) e quanto Picloram (Fig. 18-B) em baixas concentrações (5 μ M) de auxinas são capazes de induzir a formação de embriões somáticos em palmeiras.

Na linhagem LT10, pode-se visualizar os embriões com facilidade (Fig. 19-B), sendo mais definido, com presença de protoderme, cordões procambiais nítidos e meristemas fundamentais na linhagem LT10 (Fig. 19-B).

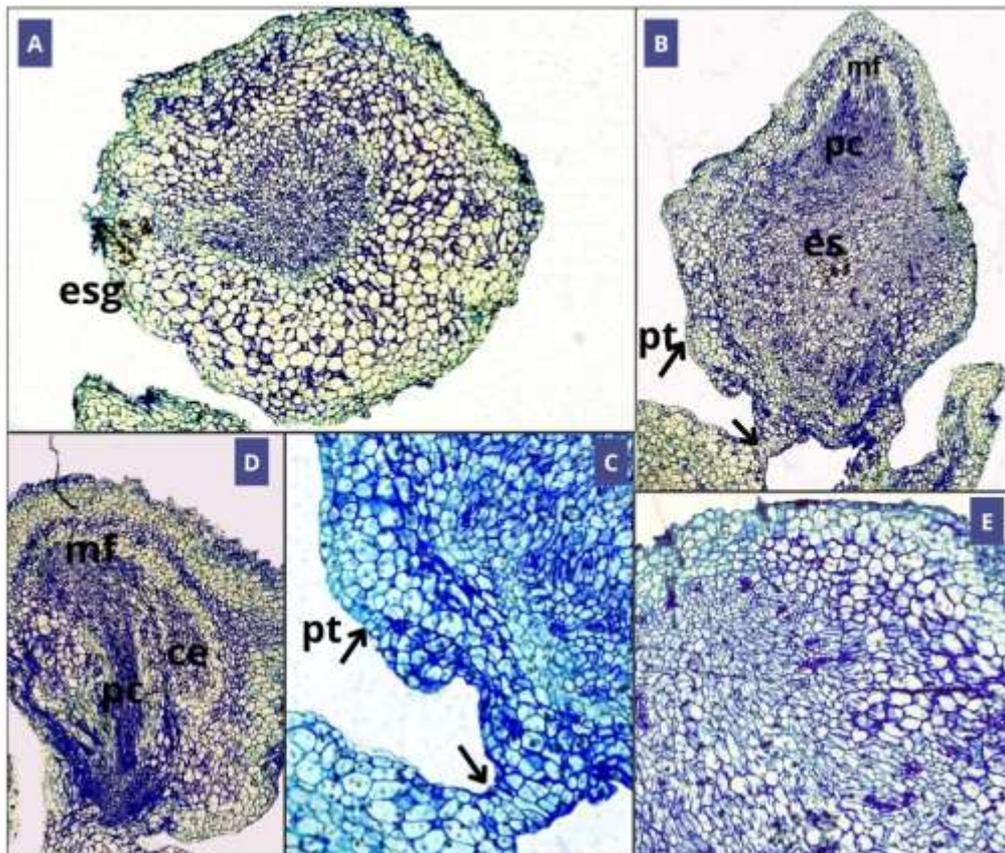


Figura 18. Secções anatômicas de agregados celulares oriundas de inflorescências imaturas de *Euterpe precatoria* Mart. (açai-solteiro) após 100 dias de cultivo em meio líquido contendo Picloram (M1) para a linhagem LT10. A. possível embrião somático globular. B-C-D. A: secção anatômica de embrião somático definido com estrutura similar ao suspensor (seta), notar a protoderme (seta), procâmbio e meristema fundamental. E. Secção anatômica do calo. Abreviações: (esg) embrião somático globular; (pc) procâmbio; (mf) meristema fundamental; (pt) protoderme; (es) embrião somático; (ce) células embriogênicas. A-B-C=10x; D-E=20x.

Na linhagem LT10, verificou-se indícios de origem unicelular dos embriões somáticos, dada a visualização de estruturas similares a suspensores (Fig. 19 B-C), o que aumenta a friabilidade do material, pela maior facilidade de desprendimento. A origem unicelular tem sido associada com a embriogênese somática de *E. precatoria* (FERREIRA et al., 2022a, b). Esses resultados ratificam o potencial embriogênico da linhagem.

Na linhagem LT12, observaram-se proembriões em estádios de desenvolvimento e oriundos de ciclos repetitivos de embriogênese somática (Fig. 19 A-J). A secção anatômica evidencia áreas meristemáticas/embriogênicas, e grande a massa calogênica de característica embriogênica (Fig. 20).

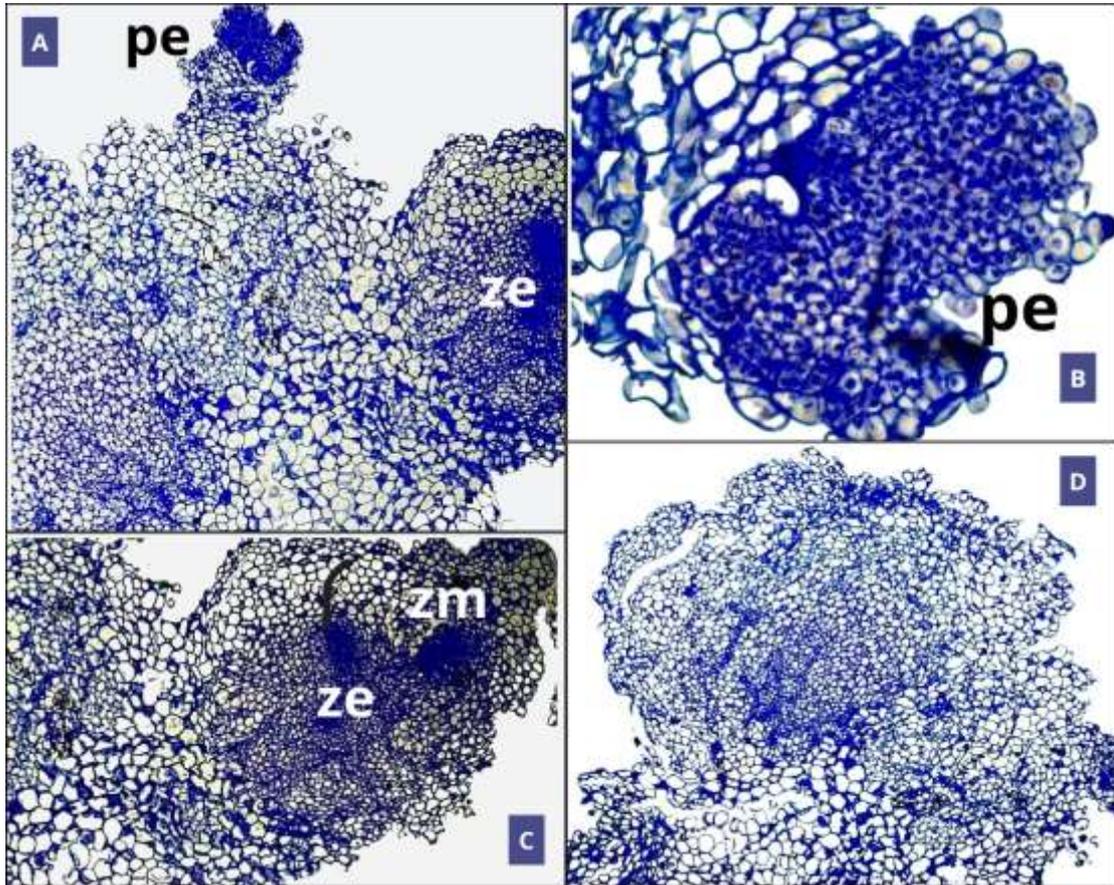


Figura 20. Secções anatômicas de agregados celulares oriundas de inflorescências imaturas de *Euterpe precatoria* Mart. (açai-solteiro) após 100 dias de cultivo em meio líquido PIC+ANA (M3) para a linhagem LT12. A. Secção anatômica evidenciando calo com zona embriogênica e meristemática e proembriões. B. Detalhe da letra A com proembriões. C. Calo com zona meristemática/embriogênica. D. Secção anatômica do calo. Abreviações: (pe) proembrião; zona embriogênica (ze); (zm) zona meristemática. Configurações das imagens A-C-D = 4x; B = 20x.

Essas linhagens constituíram os principais materiais genéticos testados nos novos meios, sendo possível conservar o potencial embriogênico das mesmas, bem como promover a diferenciação de embriões somáticos no estágio torpedo e globular.

Características do crescimento e morfologia dos calos e agregados celulares de materiais somáticos de inflorescências imaturas de *Euterpe precatoria*

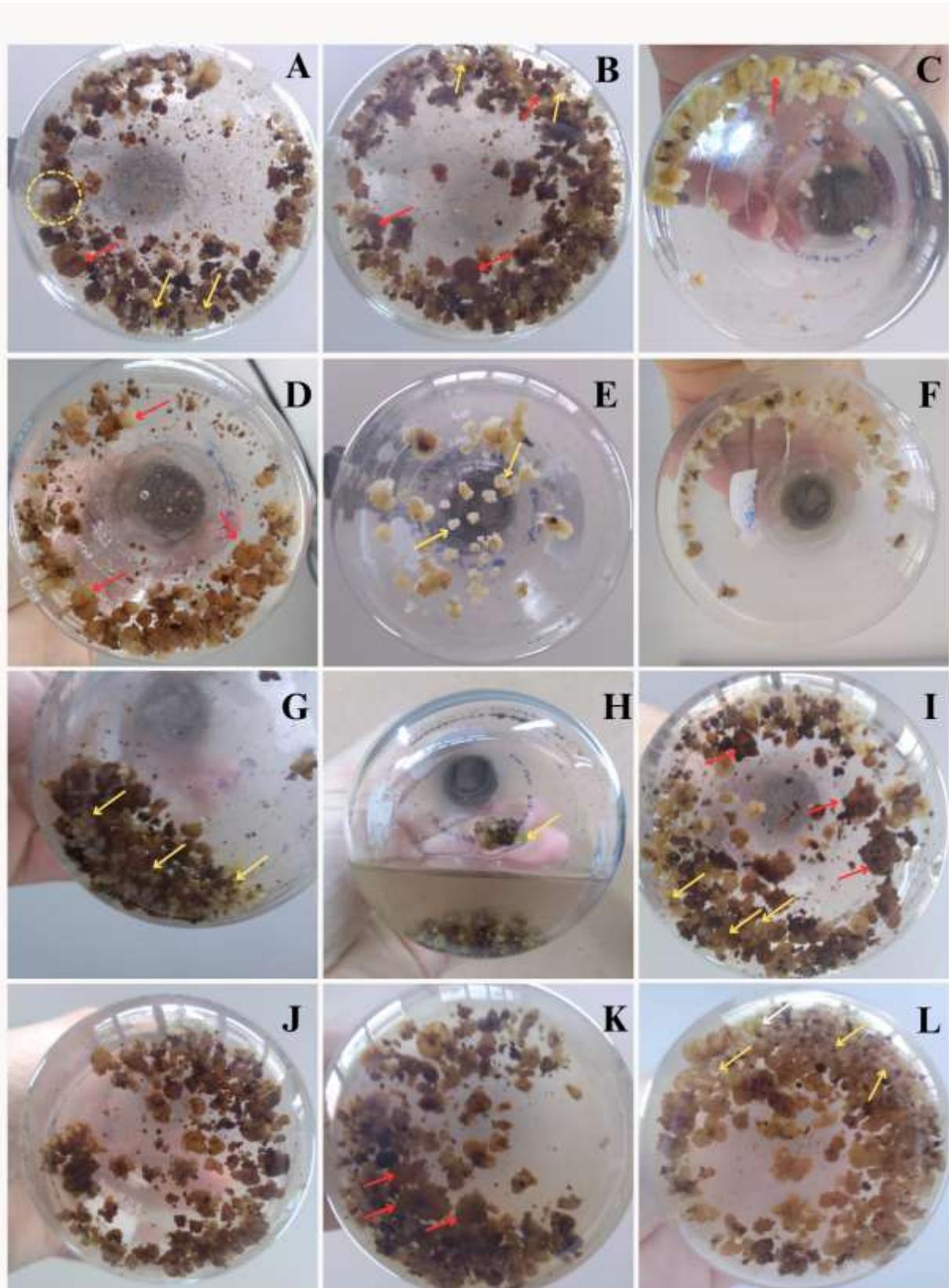


Figura 21. Aspectos morfológicos do crescimento em suspensão de calos e agregados celulares de linhagens de inflorescências imaturas de *Euterpe precatoria* em diferentes meios de cultivo. A-B: Calos cultivados em meio contendo Picloram+ANA. Multiplicação evidente em calos de natureza dura (círculo amarelo); Calos de natureza dura (seta vermelha); Calos branquinhos de aspectos friáveis (seta amarela). C-D: Calos cultivados em meio contendo 2,4-D+AIB: Pouca multiplicação alcançada e presença de calos com consistência dura (seta vermelha). E-F: Calos cultivados em meio contendo 2,4-D+ANA: Pouca multiplicação alcançada e presença de calos friáveis branquinhos (seta amarela). G-H: Calos cultivados em meio contendo Picloram+ANA: Multiplicação alcançada e presença de calos friáveis branquinhos (seta amarela). I-J: : Calos cultivados em meio contendo 2,4-D: Calos branquinhos de aspectos friáveis (seta amarela) e calos com consistência dura (seta vermelha). K-L: Calos cultivados em meio contendo Picloram: Calos branquinhos de aspectos friáveis (seta amarela) e calos com consistência dura (seta vermelha).

Conforme as imagens acima (Figura 21), pode-se observar a presença de calos branquinhos, de características friáveis (Fig. 21-A, C, G, I e L). Calos branquinhos do tipo friável também foram constatados com predominância no meio com combinação das auxinas Picloram e AIB, bem como em 2,4-D e Picloram.

Verifica-se também a presença de calos de natureza dura (21-A, B, C, D, I e K). A presença de calos com aumento de massa e tons levemente verdes são verificados nos calos cultivados somente com Picloram (Fig. 12-I-K). Calos esverdeados com grandes massas não foram verificados nas linhagens em florescências, sendo-os menores que os calos esverdeados que surgiram nas linhagens de folhas que apresentaram essa característica geralmente apresentavam aspecto duros/compactos.

As linhagens de inflorescências também conseguiram capacidade de se multiplicar mesmo quando estavam sob oxidação, mantendo a mesma característica evidenciada nas folhas quanto ao tempo submerso, havendo ciclos mais curtos.

O oposto do que ocorreu em folhas imaturas foi verificado em inflorescências, em que os meios que as auxinas não eram combinadas, as novas estruturas eram mais adaptadas ao meio.

Algumas linhagens de inflorescências foram capazes de induzir materiais que se assemelham a uma suspensão de sob comportamento celular, embora nota-se a presença de microcalos no meio. As linhagens que apresentaram esse comportamento foram cultivadas em meio com combinação de auxinas, uma ocorreu pela combinação de Picloram com ANA (Fig. 22) e a outras ocorreu pela combinação de 2.4-D com AIB (Fig.23).

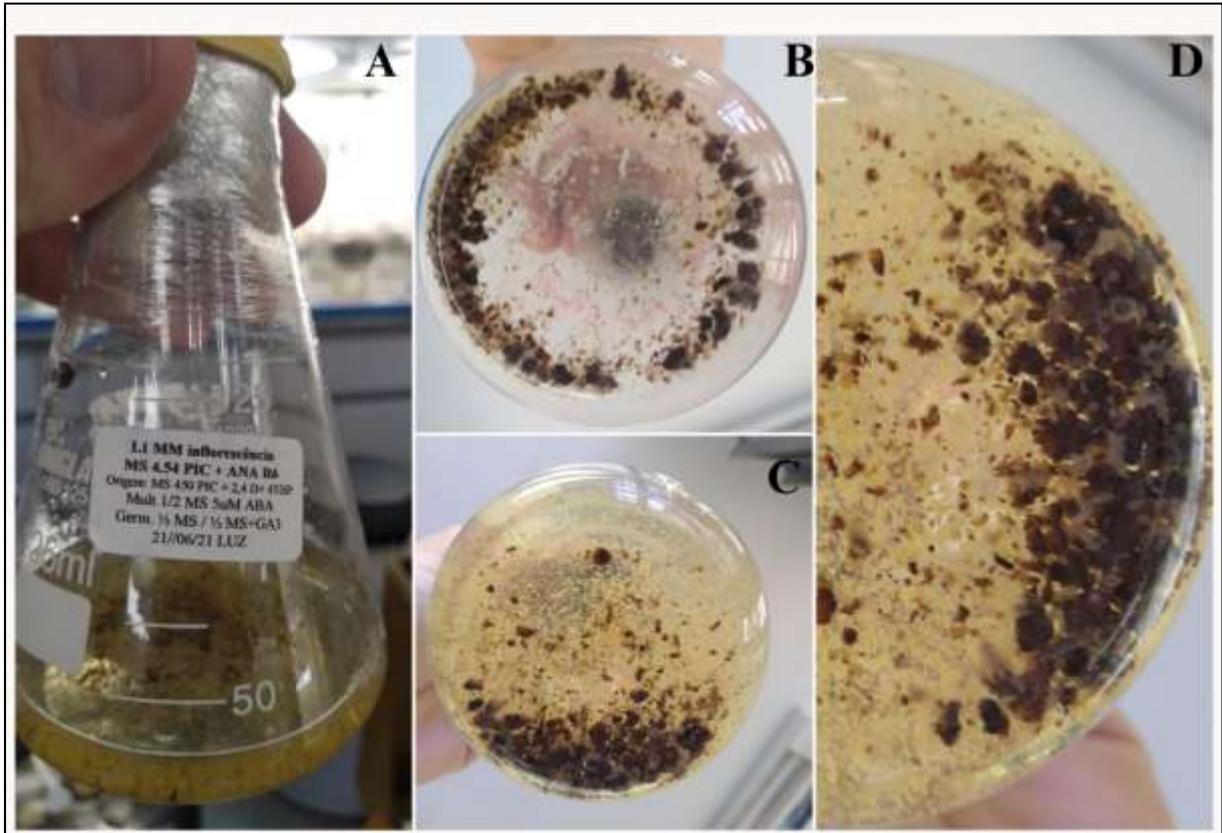


Figura 22. Aspectos morfológicos do possível crescimento celular em suspensão de calos e agregados celulares de linhagens de inflorescências imaturas de *Euterpe precatoria* em meio de cultivo contendo a combinação de Picloram com ANA.

As estruturas são visíveis e o crescimento pode ser facilmente visto quando se compara a figura 22 nos itens A, B e C. Para linhagem inoculada em meio líquido, isso também pode ser facilmente observada quando se compara a evolução do crescimento celular na figura 23, nos itens B, D, E e F, verificando do início à senescência da suspensão celular.

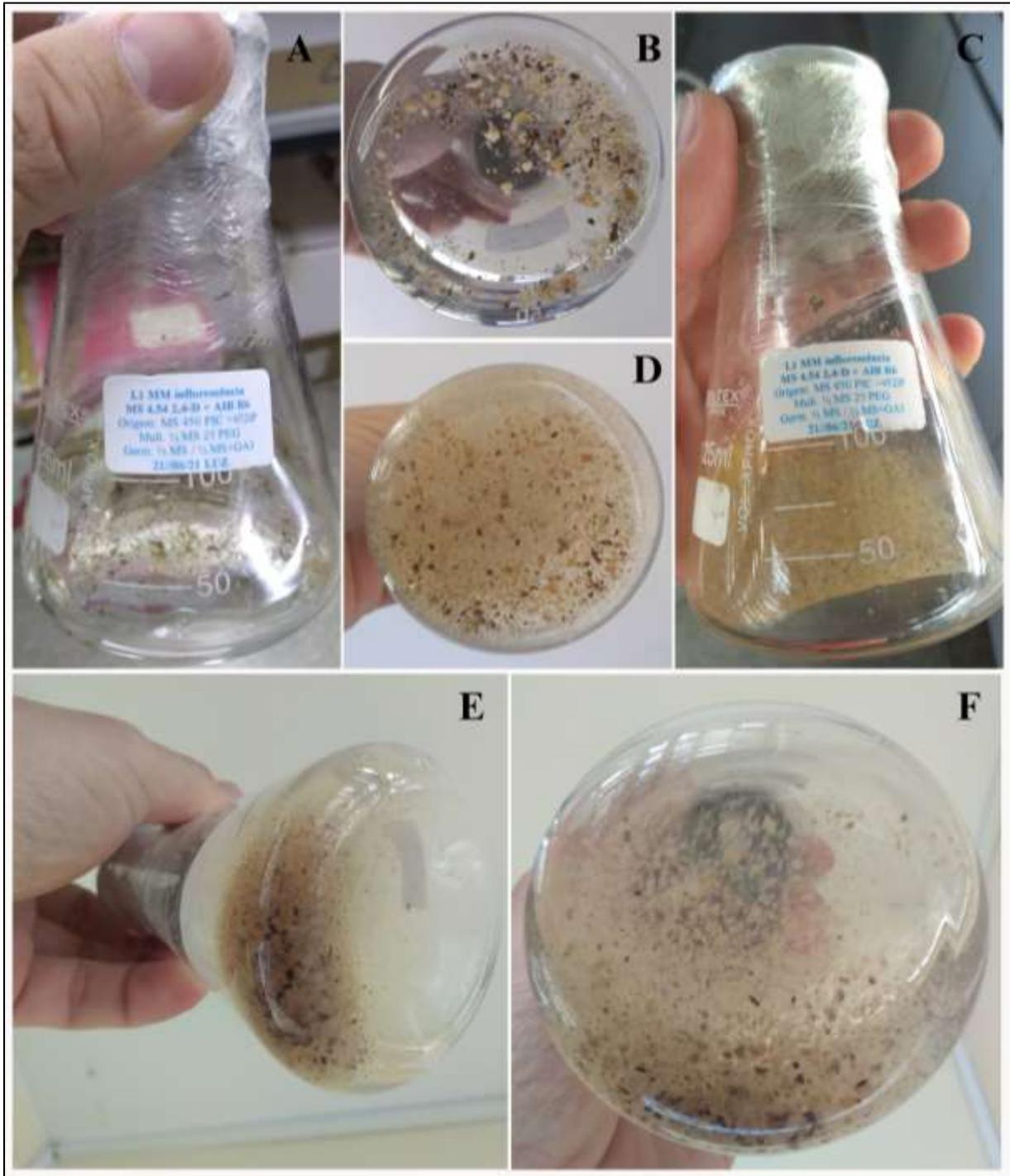


Figura 23. Aspectos morfológicos do possível crescimento celular em suspensão de calos e agregados celulares de linhagens de inflorescências imaturas de *Euterpe precatoria* em meio de cultivo contendo a combinação de Picloram com ANA.

DISCUSSÃO

Para aprimorar a geração de calos na fase de cultivo em suspensão celular, foram conduzidas investigações sobre diversos tratamentos visando promover a formação de células embriogênicas friáveis e aprimorar o processo em suspensão. Este estudo evidencia a medida de crescimento em volume de *Euterpe precatoria* pelas linhagens nos meios testados, a dinâmica e a cinética de crescimento ao longo de 180 dias de cultivo de linhagens embriogênicas oriundas de tecidos foliares imaturos e inflorescências imaturas.

A otimização da etapa de cultura em suspensão celular foi alcançada para micropropagação de *Euterpe precatoria* em diferentes linhagens nos diferentes tipos de explantes. Em ambas as fontes de tecidos somáticos utilizados, os resultados indicam uma forte associação entre a formação de células embriogênicas friáveis pelas linhagens em razão dos meios de cultivo e utilizados, sobretudo nas linhagens de material somático oriundo de folhas imaturas.

Em inflorescências imaturas, esses resultados foram mais associados às linhagens LT7, LT10 e LT12. Em ambas as fontes de tecidos somáticos utilizados, diferenças foram identificadas no crescimento volumétrico entre as linhagens.

Nas linhagens de folhas imaturas, a expansão de massas embriogênicas de *E. precatoria* em diferentes meios de cultura aumentou o crescimento em volume das linhagens durante o período de 180 dias, demonstrando variações significativas. Nas linhagens de inflorescências imaturas esses fatores foram observados somente nas linhagens LT7, LT10 e LT12.

Até o momento atual, são escassos os estudos relacionados à indução de culturas em suspensão celular a partir de calos para espécies do gênero *Euterpe*. Apenas um estudo (MELLO et al., 2023) mencionou a produção de células embriogênicas friáveis em *Euterpe edulis*, embora a produção de massas tenha sido muito baixas.

No estudo desenvolvido por Mello e colaboradores (2023), a maior massa média encontrada foi de 0,6716 g em 12 semanas de incubação (90 dias), a uma concentração de 15 µM de Picloram. Esses valores foram muito abaixo dos valores de algumas linhagens aqui verificados, sobretudo quando comparados com o experimento de folhas imaturas. Os autores verificaram um percentual de incremento de massa equivalente à 235,8% nessa concentração de Picloram. As demais concentrações de Picloram 25, 35 e 45 µM alcançaram 170, 180 e 160 % de taxa média de crescimento, respectivamente.

Nesta pesquisa, os calos embriogênicos cultivados nos meios otimizados foram capazes de aumentar seu volume em até 20 vezes para cultivo em suspensão de tecidos somáticos de folhas imaturas, representando um crescimento de mais de 1400%. Para linhagens de

inflorescências imaturas, o crescimento em volume aumentou mais de 10 vezes mais o volume inicial inoculado, representando um crescimento próximo a 1000%, para as linhagens com maior incremento de volume.

No experimento com materiais somáticos com inflorescências, os resultados de alguns são parecidos com os verificados por Mello et al. (2023), aos 90 dias de incubação. Nesse período, a linhagem LT8 cresceu 192,5%, a LT9 245% e a LT11 387,5% (Figura 16). Em termos de variação ao longo dos 180 dias de cultivo, a LT8 variou de percentual entre 85 e 150%, a LT9 variou entre 72,5 e 245% e LT11 variou entre 150 e 387,5% (Figura 16).

Embora o crescimento tenha sido muito expressivo, o crescimento dos calos e agregados celulares de *E. precatoria* não foi uniforme para algumas linhagens. Para superar essa dificuldade e promover um crescimento mais homogêneo, uma próxima etapa deve ser investigada a fim de possibilitar um desenvolvimento mais equitativo das suspensões. Ainda que seja algo não desejável, isso não constitui uma limitação para cultivo em suspensão.

Fica difícil uma comparação com o protocolo desenvolvido por Ferreira et al. (2022a) em meio semissólido, visto que os autores fizeram contagem de estruturas formadas nos meios de multiplicação, e nessa contagem podem ter sido incluídos tamanhos e massas distintas, tornando-se complicado a comparação com esta pesquisa.

Para tanto, sabe-se que a multiplicação de tecidos de folhas imaturas neste estudo em meio líquido, foi tão eficaz quanto no protocolo inicial em meio semissólido com folhas imaturas, estabelecidos por Ferreira e colaboradores (2022a).

Dessa forma, com base nos resultados, o meio de suspensão permite uma eficiente proliferação de estruturas com competência embriogênica, sob movimentos repetitivos em agitador orbital industrial a 100 rpm. Os setores embriogênicos produzidos em meio de suspensão foram predominantemente mais individualizados que os setores desenvolvidos por Ferreira et al. (2022 a,b). Esse comportamento pode favorecer o desenvolvimento de embriões saudáveis e sem anormalidades (MONTEIRO et al., 2018).

A conversão para embriões somáticos utilizando o cultivo em suspensão tem contribuído positivamente nesse sentido, como foi observado nos casos de *E. guineensis* (HASHIM et al. 2018; MONTEIRO et al. 2018) e *Phoenix dactylifera* (NAIK e Al-KHAYRI et al., 2016, 2018).

A dinâmica de crescimento mostra o incremento em volume dos experimentos no meio de cultura em suspensão. A análise da cinética de crescimento e a aplicação do modelo matemático de Gompertz permitiram verificar o comportamento das diferentes linhagens utilizadas.

No entanto, em ambos tecidos pesquisados (folhas imaturas e inflorescências imaturas), as dinâmicas de crescimento dos calos foram distintas entre as linhagens nos seis meios, evidenciadas tanto por observações morfológicas quanto por medições de volume celular (mL).

Nos dois tipos de explantes utilizados (folhas e inflorescências), os materiais somáticos proporcionaram diferentes tempos para fase lag (λ). Embora os cultivos tenham sido homogeneizados antes da inoculação em suspensão, não se deve descartar a hipótese de que as células poderiam ter entrado em diferentes estádios de desdiferenciação e com capacidade de competência embriogênica variável. Tal fato pode ter causado interferência no tempo resposta das linhagens quando inoculadas na suspensão, resultando em tempos maiores, menores ou ausentes da fase lag.

As linhagens provenientes no meio líquido exibiam características anatômicas distintas devido à aplicação de diferentes composições do meio em relação a diferentes reguladores de crescimento. Essas estruturas se tornaram mais distintas, desenvolvendo desde áreas esféricas claramente definidas, a áreas com superfícies irregulares, embora em ambas havia presença de células meristemáticas. Por conseguinte, foram identificadas como estruturas embriogênicas. Esse comportamento também foi observado por Mello et al. (2023), Ferreira et al. (2022 a,b); Ferreira et al.(2020), Silva-Cardoso et. al. (2020), Gomes et al. (2017) e Polesi et al. (2022)

Com tonalidades mais fortes e azul mais intenso, as células embriogênicas eram perceptíveis, sobretudo nos meios contendo 2,4-D. Essa característica foi identificada tanto em cultivo de folhas imaturas, quanto de inflorescências imaturas. Assim, com base nas secções, os materiais cultivados em meio 2,4-D apresentaram maiores capacidades de divisão celular (Figuras 10 e 18). Mello et al. (2023) relataram essa característica em meio suplementado com Picloram.

Em pesquisas com conduzidas culturas de *C. nucifera* em meio líquido, Bhavyashree et al. (2016) notaram que tratamentos com o regulador 2,4-D favoreceram o crescimento mais eficaz das suspensões quando comparadas ao meio contendo auxina Picloram. O meio contendo 2,4-D também foi eficaz na proliferação em meio líquido de *Elaeis guineensis* (MONTEIRO et al., 2018), *Phoenix dactylifera* L. (NAIK e Al-KHAYRI, 2018), *Camellia oleifera* (FANG LI et al., 2021).

Embora o cultivo com Picloram tenha favorecido mais incidência de embriões somáticos (Fig. 9 e 19), também é possível verificar áreas com forte influência de divisão celular (Figura 9 e 19). Isso ratifica o potencial embriogênico das linhagens nesses meios de suspensão. Assim, embora anatomicamente seja mais evidente utilizando a auxina 2,4-D, a proliferação de setores

embriogênicos em *E. precatória* pode ser possível em qualquer uma das auxinas para o cultivo em meio líquido.

As análises anatômicas também revelaram a presença de proembriões e embriões somáticos do tipo torpedo e globulares. Foram observados embriões somáticos em estádios mais avançados de desenvolvimento (estágio de torpedo) (Figura 9 e 19). Esses embriões apresentavam características anatômicas como protoderme, procâmbio e meristema fundamental. Os embriões do tipo torpedo também apresentavam superfícies irregulares, com ciclos de ES ocorrendo nas suas extremidades, possivelmente em função da fase estacionária avançada (Figura 9 e 19).

O procâmbio era composto por células alongadas quanto calo friável com vários proembriões foram observados Ferreira et al. (2022a) também verificaram esse comportamento em explantes de *Euterpe precatória* na fase de diferenciação em cultivos no meio semissólido.

Na maioria das linhagens, entre 90 e 100 dias de cultivo, a suspensão estava sob fase estacionária. As análises anatômicas evidenciaram que nesse período, havia também materiais de consistência friável, isto é, mais desdiferenciadas em razão dos ciclos da ES (Figura 10 e 18).

Assim, apesar de haver diferenças significativas entre os períodos de 90 a 135 dias de cultivo nas duas fontes de explantes testadas, recomenda-se que seja feito a transferência e plaqueamento aos 90 dias em meio líquido, visto que podem ser diminuídos problemas com variações somaclonais (LARKIN E SCOWCROFT 1981).

Uma concentração de 2,4-D ou Picloram (5 µM) associado ao AIB ou ANA suplementado por diferentes aminoácidos presentes no meio influenciam positivamente a formação de setores embriogênicos, permitindo a multiplicação eficiente das linhagens em meio de suspensão. Em folhas, todas as combinações foram satisfatórias. Em inflorescências, as mais favoráveis foram 2,4-D, Picloram e Picloram+ANA.

Em folhas, resultados utilizando apenas a auxina Picloram ou apenas 2,4-D, resultou em diferenças significativas maiores do que em outros meios. Isso ocorreu devido a estrutura morfológica dos calos terem sido bem maiores que os meios com combinação de auxinas (AIB ou ANA). Para tanto, os meios contendo combinação de auxinas além de promover desempenhos satisfatórios dos calos em termos numéricos, foram mais homogêneos em suspensão quando comparados com meios sem a combinação de auxinas.

As características morfológicas dos calos grandes nos meios 2,4-D e Picloram sem associação com outras auxinas, promoveram a similaridade entre essas linhagens. Esse fato

indica uma elevada correlação entre o crescimento de linhagens com as auxinas Picloram e 2,4-D no meio líquido.

Essa constatação também foi observada por Kong et al. (em 2023), em pesquisas envolvendo *Cocos nucifera* no qual a adição de auxinas ao meio de cultura desencadeou uma multiplicação altamente eficiente em meio semissólido.

Embora essas observações realizadas por Kong et al. (2023) tenham sido em meio semissólido, revelaram-se úteis para aprimorar a etapa de cultura em suspensão celular. Os hormônios vegetais como as auxinas constituem os principais reguladores usados na embriogênese somática com alta taxa de sucesso (SU et al., 2015).

A inclusão de aminoácidos (como glicina e arginina), também contribuíram para um efeito positivo na formação de CE. Esse efeito é provavelmente devido ao papel desses aminoácidos como fonte de nitrogênio, o qual geralmente melhora as taxas de crescimento celular e estimula os processos morfogênicos e embriogênicos em plantas (KONG et al., 2023; GEORGE; KLERK, 2008).

Le-Feuvre e colaboradores (2013) observaram diferenças estatisticamente em relação aos suplementos de nitrogênio orgânico, como glutamina e hidrolisado de caseína. Meios de cultura com maior teor de glutamina demonstraram superioridade, resultando em taxas de crescimento mais elevadas em comparação com meios com menor concentração de glutamina. A presença glutamina contribui para uma nutrição mais eficaz dos cultivos (LE-FEUVRE et al., 2013).

Nos protocolos desenvolvidos em *E. precatoria*, em meio semissólido, o uso de aminoácidos como L-glutamina e caseína hidrolisada tem sido usado como fonte de suplementos importantes para o desenvolvimento embriogênico (FERREIRA et al., 2022a-b; FERREIRA 2020).

A presente pesquisa fornece evidências estatísticas de que a adição de aminoácidos e vitaminas promoveram um supercrescimento de *E. precatoria*. Resultados importante foram alcançados pela adição de mais aminoácidos ao meio, e pela inclusão de vitaminas (tiamina, mio-inositol e ácido ascórbico). Isso sustenta a hipótese de que tanto suplementação por aminoácidos e quanto de vitaminas são cruciais para melhorar o desempenho dos setores embriogênicos em meio líquido de *E. precatoria*, estimulando a formação de CE friáveis (Tabela 4).

Os aminoácidos possuem função essencial no correto dobramento das proteínas (POLESI et al., 2022). O uso de aminoácidos e vitaminas (glutamina e ácido ascórbico) também proporcionaram excelentes resultados em cultivo de *E. guineensis* em meio líquido (MONTEIRO et al., 2018). Em geral, os aminoácidos melhoram o metabolismo celular,

desempenhando uma síntese de proteínas mais eficiente, bem como de açúcares de reserva (PARAST et al., 2011), favorecendo o crescimento e desenvolvimento celular (MELLO et al., 2023)

A otimização do meio de cultivo mostrou-se eficiente para obtenção calos embriogênicos em suspensão de *E. precatória*. Isso representou um requisito muito importante para uma otimização além das expectativas. Os resultados desses estudos serão úteis para melhorar a taxa de formação de CE em outras espécies.

Todavia, esses resultados também indicam que é necessário avaliar outras vias de suplementação (cisteína, por exemplo) para tentar conter problemas com oxidação dos setores embriogênicos.

Nas pesquisas desenvolvidas por Mello et al. (2023) a oxidação nos experimentos conduzidos ocorreu após as 12 semanas de incubação (90 dias após a inoculação), nas maiores concentrações de Picloram (45 μM). Os pesquisadores ainda constataram que menores concentrações de Picloram proporcionaram menores escurecimentos dos calos.

Esse dado é importante para o contínuo melhoramento das condições de cultivo, pois embora as concentrações de Picloram utilizadas por Mello e colaboradores (2023) tenham sido maiores (15, 25, 35 e 45 μM) que as concentrações utilizadas nesta pesquisa, os resultados das taxas de oxidação condizem com os resultados aqui verificados.

Dessa forma, deve-se atentar ao nível usado de cada aminoácido neste estudo, pois embora tenha favorecido o crescimento dos calos e agregados celulares das linhagens, não foi suficiente para controlar o estresse oxidativo em alguns períodos. O uso de aminoácidos em condições ideais pode favorecer propriedades antioxidantes que combatem o estresse oxidativo na membrana celular, além de contribuir para a estabilização da estrutura nativa e fisiologicamente ativa das proteínas (COLOVIĆ et al., 2018).

O estresse oxidativo surge durante o cultivo *in vitro*. Ele é caracterizado por um desequilíbrio na proporção entre a produção de compostos antioxidantes e compostos oxidantes (BARBOSA et al., 2014), os quais ativam os sistemas de sinalização das plantas (MOLLER et al., 2007). O estresse oxidativo ocorre devido à forte formação imediata de espécies reativas de oxigênio (BARREIROS et al., 2006). Esse desequilíbrio, causado pela formação imediata de espécies reativas de oxigênio quando presentes em excesso, podem oxidar proteínas, ácidos graxos insaturados e DNA (BARBOSA et al., 2014), resultando em danos celulares e, em última instância, morte celular (Barbosa et al., 2014; TRIPATHI et al., 2020).

A presença de cisteína causa uma redução significativa no escurecimento não enzimático em sistemas que contêm asparagina e glutamina. Embora não se compreenda completamente o

papel da glicina como inibidor desse escurecimento, sabe-se que ela contribui para manter a estabilidade das membranas celulares e das proteínas vegetais em condições de estresse. Isso resulta em uma maior tolerância à salinidade, além de temperaturas elevadas e baixas (FEDOTOVA; KRUCHININ, 2017; SUN et al., 2020).

Todavia, como ainda não se têm informações sobre a influência dos aminoácidos no escurecimento das linhagens, e por isso recomenda-se estudos para investigar as concentrações ideais que possa garantir redução progressiva do estresse oxidativo. Esse tipo de estudo também pode evitar efeitos adversos contrários ao desejado. É possível aprofundar a identificação da oxidação em tecidos cultivados *in vitro* (BASKARAN et al., 2015) por meio de estudos que considerem a atividade de enzimas antioxidantes (MANQUÍAN-CERDA et al., 2016). O uso de marcadores bioquímicos, como a peroxidase, pode reduzir a subjetividade associada à identificação visual da morfogênese *in vitro* e contribuir para a detecção precoce desses processos (BASKARAN et al., 2015).

Dessa forma, esta pesquisa constitui uma peça importante no que se refere ao cultivo em suspensão de *Euterpe precatoria*, pois evidencia que a modificação das concentrações de nutrientes dos meios de cultivos permite o melhoramento da suspensão, sendo fundamentais na busca de condições ótimas de cultivo.

CONCLUSÃO

Para as linhagens cultivadas com combinações de auxinas em folhas imaturas o protocolo de cultivos de açaí solteiro (*E. precatoria*) em meio de consistência líquida foi otimizado;

Para as linhagens cultivadas sem combinações de auxinas em inflorescências imaturas o protocolo de cultivos de açaí solteiro (*E. precatoria*) em meio de consistência líquida foi otimizado;

A produção de calos embriogênicos friáveis foi melhorada tanto em linhagens folhas imaturas quanto em linhagens de inflorescências imaturas;

As linhagens apresentaram diferença significativa em razão do efeito das composições dos meios de cultivo ao longo do tempo;

A oxidação não impede a produção de calos embriogênicos friáveis tanto em linhagens folhas imaturas quanto em linhagens de inflorescências imaturas;

A melhor época de transferência para o plaqueamento em geral consiste entre os 90 e 135 dias;

O modelo de Gompertz permite verificar a dinâmica e a cinética do crescimento;

O modelo de Gompertz permite verificar a melhor época de transferência para o plaqueamento, sendo variável de linhagem para linhagem;

Os calos podem ser multiplicados tanto usando auxina Picloram quanto 2, 4 -D;

As análises anatômicas revelam que os calos possuem competência embriogênica.

REFERÊNCIAS

ALVES, G., RAMOS, R.P. (2019). Açaí Berry: Brazil's Super Fruit. In: Pullanikkatil, D., Shackleton, C. (eds) Poverty Reduction Through Non-Timber Forest Products. Sustainable Development Goals Series. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75580-9_4.

BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; RANGEL CAMARA, T. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, 2014.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. D. L. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, n.1, p.113-123, 2006.

BASKARAN, P., KUMARI, A., NAIDOO, D., & VAN STADEN, J. In vitro propagation and biochemical changes in Aloe pruinosa. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 51-58, 2015.

BHAVYASHREE U, LAKSHMI JAYARAJ K, MURALIKRISHNA KS, SAJINI KK, RAJESH MK, KARUN A. 2016. Initiation of coconut cell suspension culture from shoot meristem derived embryogenic calli: A preliminary study. **Journal of Phytotherapy** 8: 13–16.

CABRAL, G.B.; CARNEIRO, V. T. C.; ROSSI, M. SILVA, J.P.; MARTINELLI, A.P.; DUSI, D.M.A. Plant regeneration from embryogenic callus and cell suspensions of *Brachiaria brizantha*. **In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant**, v. 51:369–377, 2015. DOI 10.1007/s11627-015-9690-0

COLOVIC, M. B. et al. Sulphur-containing amino acids: protective role against free radicals and heavy metals. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 324-335, 2018.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção de Açaí (cultivo). 2023. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/acai-cultivo/br>> Acesso em: 21 de agosto 2023.

FANG LI.; S. YE.; T.W.; XU, X.; YUAN, D.Y.; XIAO, S.X. Callus induction, suspension culture and protoplast isolation in *Camellia oleifera*. **Scientia Horticulturae**, v.286 (2021); pp. 110193.

FEDOTOVA, M. V.; KRUCHININ, S. E. Hydration and ion-binding of glycine betaine: how they may be involved into protection of proteins under abiotic stresses. **Journal of Molecular Liquids**, v. 244, p. 489-498, 2017.

FEHÉR, A. Calo, desdiferenciação, totipotência, embriogênese somática: o que esses termos significam na era da biologia molecular das plantas? **Front Plant Sci** 10:536, 2019. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536>

FERREIRA, D. F. SISVAR: A COMPUTER ANALYSIS SYSTEM TO FIXED EFFECTS SPLIT PLOT TYPE DESIGNS. **Revista brasileira de biometria**, [S.l.], v. 37, n. 4, p. 529-535, dec. 2019. Doi: <https://doi.org/10.28951>

FERREIRA, J. C. B. **Embriogênese Somática de Açaí Solteiro (Euterpe precatoria Mart.)**. 2020. 259f. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências Florestais) - Universidade de Brasília, DF, 2020.

FERREIRA, C.D.; SILVA-CARDOSO, I.M.A.; FERREIRA, J.C.B.; COSTA, F.H.S.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Morphostructural and histochemical dynamics of *Euterpe precatoria* (Arecaceae) germination. **J Plant Res.**, 133:693–713, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10265-020-01219-7>

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

FERREIRA, J.C.B.; DE ARAÚJO SILVA-CARDOSO, I.M., MEIRA, R.O.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Towards development of an efficient somatic embryogenesis protocol for the palm tree *Euterpe precatoria* (Mart.) from leaf tissues of adult plants. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant** 58, 750–768, 2022a. <https://doi.org/10.1007/s11627-022-10310-8>. b

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.

GEORGE, E.F.; DE KLERK, G.-J. The components of plant tissue culture media I: Macro- and micro-nutrients. In **Plant Propagation by Tissue Culture: The Background**, 3rd ed.; George, E.F., Hall, M.A., De Klerk, G.-J., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2008; Volume 1, pp. 65–113.

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 Tiss Organ Cult**, v. 131, n. 2, p. 269-282, 2017.

HASHIM AT, ISHAK Z, ROSLI SK, *et al.* 2018. Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) Somatic Embryogenesis In: Jain SM, Gupta P, eds. **Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants**. Switzerland: Springer, 209–229.

KONG, EYY; BIDDLE, J.; FOALE, M.; ADKINS, SW Cultura em suspensão celular: Um potencial método de cultura in vitro para propagação clonal de mudas de coco via embriogênese somática. **Colheita Ind. Prod**, v. 147, 112125, 2020.

KONG, E.Y.Y.; BIDDLE, J.; KALAIPANDIAN, S.; ADKINS, S.W. Coconut Callus Initiation for Cell Suspension Culture. **Plants**, v. 12, n. 968, 2023. <https://doi.org/10.3390/plants1204096>.

LARKIN PJ, SCOWCROFT WR. Somaclonal variation — a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**. **1981**, v. 60: 197–214.

LE-FEUVRE R, TRIVIÑO C, SABJA AM, BERNIER-CARDOU M, MOYNIHAN MR, KLIMASZEWSKA K (2013) Organic nitrogen composition of the tissue culture medium influences *Agrobacterium tumefaciens* growth and the recovery of transformed *Pinus radiata* embryonal masses after cocultivation. **In Vitro Cell Dev Biol Plant** 49:30–40.

MANQUIÁN-CERDA, K., ESCUDEY, M., ZÚÑIGA, G., ARANCIBIA-MIRANDA, N., MOLINA, M., & CRUCES, E. Effect of cadmium on phenolic compounds, antioxidant enzyme activity and oxidative stress in blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) plantlets grown in vitro. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 133, p. 316-326, 2016.

MATSYAGIRI, L.; HEMAMALINI. K.; YATA, Y.; MULUGU, N.V.; MANNYAM, R.H.P. A scientific review on: acai berry fruit (*Euterpe oleracea*) a potential super fruit of world. **Indo American Journal of Pharmaceutica Research**, v. 11, n. 10. 2021. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5666301>

MELLO, T., SILVA, T. D., ZANARDO, T. É. C., et al. (2024). Somatic embryogenesis in *Euterpe edulis* Martius is improved by wounding, explant orientation, and suspension culture. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, 156, 31. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02649-6>.

MØLLER, I. M., JENSEN, P. E. & HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.58, p. 459-481, 2007.

MONTEIRO, T. R., FREITAS, E. O., NOGUEIRA, G. F., & SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Assessing the influence of subcultures and liquid medium during somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 93, n. 2, p. 196-203, 2018.

MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

MUSTAFA, N.R.; DE WINTER, W.; VAN IREN F.; VERPOORTE R. Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. **Nat Protoc**. 2011 Jun;6(6):715-42. doi: 10.1038/nprot.2010.144. Epub 2011 May 5. PMID: 21637194

NAIK, P.M. AL-KHAYRI, L.M. Cell suspension culture as a means to produce polyphenols from date palm (*Phoenix dactylifera* L.) **Ciência e Agrotecnologia**, v. 42, n.5, p.464-473, 2018.

NAIK, M.P.; AL-KHAYRI, J.M. Somatic Embryogenesis of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Through Cell Suspension Culture. In: MOHAN JAIN (ed.), **Protocols for In Vitro Cultures and Secondary Metabolite Analysis of Aromatic and Medicinal Plants, Second**

Edition, Methods in Molecular Biology, vol. 1391, DOI 10.1007/978-1-4939-3332-7_25, © Springer Science+Business Media New York 2016.

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.

PARAST BM, CHETRI SK, SHARMA K, AGRAWAL V. In vitro isolation, elicitation of psoralen in calluscultures of *Psoralea corylifolia* and cloning of psoralen synthase gene. **Plant Physiol Biochem.** 2011, v. 49:1138-1146. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.03.017>

POLESI, L.G.; FRAGA, H.P.F.; GOETEN, D. et al. Morphohistological and biochemical features of the *Guadua chacoensis* (Bambusoideae; Poaceae) somatic embryogenesis. **Plant Cell Tiss Organ Cult** 148, 479–499 (2022). <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02199-9>.

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

SEDAP. (Secretaria de Estudo de Desenvolvimento Agropecuário e de Pesca do Estado do Pará). Governo do Estado do Pará. **AÇAÍ NO ESTADO DO PARÁ: área plantada, área colhida, quantidade produzida, valor da produção e rendimento médio (2015-2019)**. Belém: SEDAP, 2020.

SILVA-CARDOSO, I.M.A; MEIRA, F. S; GOMES, A. C. M. M; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Histology, histochemistry and ultrastructure of pre-embryogenic cells determined for direct somatic embryogenesis in the palm tree *Syagrus oleracea*. **Physiologia plantarum**, v. 168, n. 4, p. 845-875, 2020.

SILVA, I.M.A.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Somatic embryogenesis as a tool for propagation of palm trees (Arecaceae): principles, strategies and challenges. In: Bettaieb, T. **Micropropagation of Ornamental Plants**. Nova Science Publishers, Inc. 2018. p. 139-194.

SOUZA, F. G.; LIMA, R.A. A Importância da Família Arecaceae para a Região Norte. **Revista EDUCamazônia**, Amazonas, v. 23, n. 2, p.100-110, 2019

STARITSKY, G. Tissue culture of the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) as a tool for its vegetative propagation. **Euphytica**, v. 19, n. 3, p. 288-292, 1970.

STURGES, H. A. The Choice of a Class Interval. **Journal of the American Statistical Association**, v. 21, n. 153, p. 65-66, mar. 1926.

SU, Y.H., LIU, Y.B., BAI, B., AND ZHANG, X.S. (2015). Establishment of embryonic shoot-root axis is involved in auxin and cytokinin response during Arabidopsis somatic embryogenesis. **Front. Plant Sci.** 5: 792.

SUN, H. et al. Exogenous glycine betaine treatment alleviates low temperature-induced pericarp browning of 'Nanguo' pears by regulating antioxidant enzymes and proline metabolism. **Food Chemistry**, v. 306, p. 125626, 2020.

TRIPATHI, D., NAM, A., OLDENBURG, D. J., & BENDICH, A. J.. Reactive oxygen species, antioxidant agents, and DNA damage in developing maize mitochondria and plastids. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 596, 2020

WÓJCIK AM, WÓJCIKOWSKA B, GAJ MD. Perspectivas atuais sobre a rede genética mediada por auxina que controla a indução da embriogênese somática em plantas. **Int J Mol Sei** 21(4):1333, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21041333>

ZEBO LIU, XIAOFENG ZHU, ALI MOHSIN, ZHONGPING YIN, YINGPING ZHUANG, BEI ZHOU, LINXIAO DU, XUEJIAN YIN, NAN LIU, ZEJIAN WANG, MEIJIN GUO. Embryogenic callus induction, cell suspension culture, and spectrum-effect relationship between antioxidant activity and polyphenols composition of *Siraitia grosvenorii* cultured cells, **Industrial Crops and Products**, v. 176, 2022.